



Relations entre profils microbiologiques de l'environnement intérieur et maladies respiratoires infectieuses et allergiques

Steffi Rocchi

► To cite this version:

Steffi Rocchi. Relations entre profils microbiologiques de l'environnement intérieur et maladies respiratoires infectieuses et allergiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2014. Français. NNT : 2014BESA3008 . tel-01213960

HAL Id: tel-01213960

<https://theses.hal.science/tel-01213960>

Submitted on 9 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques

École Doctorale "Environnement, Santé"

Année 2014

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Franche-Comté

Spécialité Sciences de la vie et de la santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 octobre 2014

Par

Steffi ROCCHI

Relations entre profils microbiologiques de l'environnement intérieur et maladies respiratoires infectieuses et allergiques

Directeur de thèse : Pr Laurence MILLON

Co-directeur : Dr Gabriel REBOUX

Co-encadrant : Dr Anne-Pauline BELLANGER

Jury

Pr Raoul HERBRECHT
Pr Françoise BOTTEREL-CHARTIER
Pr Philippe BONNIAUD
Dr Hélène NICULITA-HIRZEL
Pr Laurence MILLON
Dr Gabriel REBOUX

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur
Co-directeur

Pour commencer ce mémoire, je tiens à remercier les nombreuses personnes qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Mes premiers remerciements vont tout d'abord à mes trois encadrants :

Je remercie chaleureusement le professeur Laurence Millon, ma directrice de thèse, pour sa grande disponibilité, ses nombreux conseils, sa confiance et sa gentillesse. Certains vous diront qu'on arrive au bout d'une thèse lorsque l'on commence à détester son directeur. Je suis ravie d'avoir eu la chance de vivre cette rare exception.

Un immense merci vient ensuite au Dr Gabriel Reboux, co-directeur de ce travail, que je ne remercierai jamais assez pour tout ce qu'il m'a apporté. Merci d'avoir cru en moi, de s'être battu pour que je réalise cette thèse (j'espère qu'on leur aura montré que je pouvais le faire). Merci pour tous les conseils, les nombreuses remarques, mêmes celles dites sans "pincettes". Merci aussi pour m'avoir impliquée dans des travaux "parallèles". C'est vraiment un plaisir de travailler ensemble, et je pense que grâce à lui, l'étudiante de M2 que j'étais ressort grandie de cette aventure.

Je remercie également profondément le Dr Anne-Pauline Bellanger qui était là, elle aussi, depuis le départ et qui m'a épaulée dans toutes les étapes sans exception. Merci pour son enthousiasme et sa motivation pour la recherche.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes du service de parasitologie-mycologie qui m'ont volontiers consacré de leur temps : un grand merci à Frédéric Grenouillet pour ses conseils, sa connaissance infaillible des patients et ses blagues du vendredi. Merci à Emeline Scherer, qui a su m'écouter et me conseiller à de nombreuses reprises. Merci à Sandrine Roussel, Florent Demonmerot que j'ai quelques fois sollicités. Je remercie également toutes les techniciennes qui m'ont aidé à mener à bien cette étude : Isabelle, qui comprenait mon émerveillement devant les observations microscopiques des moisissures; Florence, pour qui "tout va bien dans sa vie" ; Karine, Marie-Pierre, Audrey, Nanou, Séverine et Anne pour leurs aides et leur accueil chaleureux au café.

J'adresse maintenant un énorme merci à tous mes collègues/amis de la fac avec qui j'ai vécu cette aventure.

Merci à Jenny, ma vieille taupe model, qui a fait de mon bureau une serre, qui m'a fait (re)découvrir des chansons qui datent d'avant ma naissance et qui a contribué à ma thérapie pour mon obsession du rangement. Plus sérieusement, c'était un vrai plaisir d'avoir une colocataire de bureau de son niveau scientifique.

Merci au trio du bureau R28 pour leur soutien dans toutes les épreuves scientifiques et personnelles vécues ces quatre dernières années : Merci à Audrey, pour son efficacité inqualifiable. Les quelques

7000 capteurs, 3000 extractions et 800 plaques de PCR ont filé comme sur des roulettes ! Merci à Coralie, pour ses nombreux conseils (notamment 1) comment faire un titre dans word, 2) insérer une légende, 3) mettre à jour les champs) et notre expérience de futurs petits chefs d'entreprises aux entrepreneuriales. Merci à Adeline pour les discussions du soir allant des sports de combat à la dissection des oiseaux.

Merci à Alex pour nos questionnements sur l'avenir (incertain ?) ; Merci à Mallo pour ses petits trucs et astuces de manip' ; Merci à Béné pour ses conseils ; Et merci à Benoit qui m'a initié (entre autres) aux boucles de R (pour les petites xxx).

J'associe également à ces remerciements les "bactério" : Sophie, Cédric, Charlotte, Aurélie, Paulo, Arnaud, Anne-Sophie, Meryem, Catherine, Kathy et Patrick pour les moments conviviaux de midi passés ensembles. Merci aussi à Pascal et Didier de l'hygiène pour leur bonne humeur, et aux différents stagiaires qui ont défilé dans nos équipes.

Je remercie vivement les internes d'hématologie (Laura, Magalie, Anne) ainsi que Mme Goris pour le recrutement des patients. Merci aussi au Dr Françoise Schillinger, au Dr Sandrine Puyraimond, à Claude Midot et aux internes de cytologie (Jérémy, Franck, Emilie, Roch, Eleni, Audrey) pour leur aide dans la recherche des formules sanguines des patients. Merci enfin au Dr Thierry Henon pour la recherche d'historique des traitements antifongiques.

Mes remerciements vont également aux personnes de chrono-environnement : à Daniel Gilbert pour m'avoir fait confiance, à François Gillet pour son aide en statistiques, à Charles-Henri et JD nos informaticiens hors pair et à tous les autres que j'ai côtoyé toutes ces années.

Merci aussi à tous mes amis des années fac et qui ont rendu inoubliables mes soirées doctorantes. Merci à Pierre, mon premier colocataire, qui malgré la distance et ses publications dans Nature reste le même. Merci à Nico, pour sa bonne humeur, son soutien sans relâche. Et malgré son mauvais goût en termes de pull tapisserie, je suis fière qu'il soit mon ami. Merci à PE, mon bibi, pour son comique de répétition (pas toujours comique). Merci à Fab parce qu'il est tout simplement "énorme". Merci à Anne qui m'a fait découvrir la Bretagne, (presque) pas sous la pluie. Merci à Leslie, qui, en plus des autres, m'a débloquée dans mes scripts. Meri à Sev et LF pour les bons moments passés avec eux. Merci à Dom et Anne-Claude. Merci aussi aux autres doctorants de chrono-environnement, présents à "la Brass" le jeudi soir. Merci à Adeline et Adrien, doctorants d'Adoc avec qui nous avons partagé des supers moments.

Merci aussi à tous ceux qui étaient là durant ces années : Jey mon dernier colocataire, Fred, la famille Bakalao du Cap Vert (Jenif, Fredo, les petits amours, Sophette, Ean-Pierre, Polo, Loulou, tonton Jipette), les filles de la danse... (et j'en oublie sûrement).

Enfin, je tiens à remercier mes "très" proches. Un immense merci à ma maman, toujours présente, qui durant toutes ces années n'a jamais douté de moi et qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je remercie évidemment mon frère, à qui j'ai fait subir la répétition de mes premières com's devant le frigo de la cuisine et mon père, toujours fier de moi. Je remercie également Vic, pour avoir embelli ces deux dernières années et pour son aide précieuse dans mes analyses statistiques (sans jamais baisser les bras devant mon incompetence de départ dans ce domaine). Un grand merci aussi à ma tante, qui répond toujours présente ; et aussi à mes cousins et cousines. Merci aussi à mon fidèle destrier, qui était une belle échappatoire.

Enfin, je dédie ce manuscrit à ma grand-mère, qui relectrice de mon mémoire de M2 à l'époque, avait trouvé ceci passionnant. J'espère que d'où elle est, elle est fière de moi.

TABLE DES MATIERES

VALORISATION SCIENTIFIQUE	1
1. Publications à comité de relecture.....	2
1.1. Publications présentant les travaux de thèse	2
1.2. Publications liées à la thèse.....	2
1.3. Autre publication.....	3
2. Communications scientifiques	3
INTRODUCTION Pollution intérieure, intérêt de la mesure des micro-organismes.....	5
1. Problématique et législation concernant la pollution de l'air intérieur.....	6
2. Logements et problèmes d'humidité	8
3. Microorganismes de l'environnement intérieur	9
3.1. Moisissures	9
3.2. Acariens	11
3.3. Bactéries	12
4. Effets sur la santé	13
4.1. Effet infectieux	13
4.2. Effets immunologiques.....	14
4.3. Effets irritatifs et toxiques	16
4.4. Autres effets des microorganismes.....	17
4.5. Effets controversés.....	18
5. Différentes techniques de prélèvements et d'analyses.....	20
CONTEXTE / PROBLÉMATIQUE	22
1. Pathologies et système immunitaire.....	23
2. Manque de mesures et manque de standardisation des méthodes pour évaluer l'exposition aux microorganismes	24
3. ERMI	25
3.1. Description des études utilisant l'ERMI.....	25
3.2. Limites de l'ERMI	29

4. Autre approche : Indice de diversité	30
5. Bilan	31
OBJECTIFS DE LA THESE	32
CHAPITRE 1 Environnement fongique de logements et risque infectieux chez les patients immunodéprimés : Étude FIQCS et recherche de résistance.....	33
1. Contexte	34
2. Présentation de l'étude	38
3. Principaux résultats	39
4. Article présentant les résultats de l'étude FIQCS.....	40
5. Résultats complémentaires de l'étude FIQCS	41
5.1. Suivi individuel des patients	41
5.2. Analyse des EDC déposés dans les logements par qPCR.....	41
1. Contexte	44
1.1. États des lieux.....	44
1.2. Critères épidémiologiques.....	46
1.3. Arguments mécanistiques et moléculaires	48
2. Présentation d'un cas d'AI résistante, avec isolement de souches cliniques et environnementale portant la mutation TR34/L98H	49
3. Principaux résultats	49
4. Article présentant le cas d'AI résistante.....	50
CHAPITRE 2 Environnement microbiologique de logements et risque allergique chez l'enfant : Étude EBRA ELFE	51
1. Contexte	52
2. Présentation des études ELFE pilote et EBRA ELFE	56
3. Principaux résultats	57
3.1. Étude pilote EBRA ELFE	57
3.2. Étude EBRA ELFE.....	57
4. Article présentant les résultats de l'étude pilote EBRA ELFE	59
5. Article présentant les résultats descriptifs des logements de la cohorte EBRA ELFE	60
CHAPITRE 3 Environnement fongique de logements et risque d'ABPA chez des patients atteints de mucoviscidose : Étude TIARÉ.....	61
1. Contexte	62

2. Présentation de l'étude TIARÉ.....	64
3. Principaux résultats	64
CHAPITRE 4 Articles en relation avec la thèse.....	68
1. Article présentant les résultats des qPCR mucorales pour le diagnostic de mucormycoses....	69
2. Article présentant les résultats de la contamination fongique et bactérienne de 30 cabinets médicaux Franc-comtois.	70
DISCUSSION Bilan des différentes études menées	71
1. Critique des méthodes utilisées	72
2. Intérêt des mesures pour évaluer l'exposition	74
3. Environnement et risque infectieux.....	74
4. Nécessité d'une approche multifactorielle pour les maladies allergiques	75
5. Mise en place de nouveaux indicateurs ?	76
6. Perspectives.....	77
ANNEXES.....	79
RÉFÉRENCES	89

VALORISATION SCIENTIFIQUE

1. Publications à comité de relecture

1.1. Publications présentant les travaux de thèse

- Emeline SCHERER, **Steffi ROCCHI**, Gabriel REBOUX, Stéphanie VANDENTORREN, Sandrine ROUSSEL, Mallory VACHEYROU, Chantal RAHERISON, Laurence MILLON, qPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dust from dwellings in large cohort studies, *Science of the Total Environment*, 2014
- **Steffi ROCCHI**, Etienne DAGUINDAU, Frédéric GRENOUILLET, Eric DECONINCK, Anne-Pauline BELLANGER, Déa GARCIA-HERMOSO, Stéphane BRETAGNE, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON, Azole-resistant TR34/L98H *Aspergillus fumigatus* in both fungicide-sprayed field and lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis, *Journal of Clinical Microbiology*, 2014
- **Steffi ROCCHI**, Gabriel REBOUX, Fabrice LAROSA, Emeline SCHERER, Etienne DAGUINDAU, Ana BERCEANU, Eric DECONINCK, Laurence MILLON, Anne-Pauline BELLANGER, Evaluation of invasive aspergillosis risk for immunocompromised patients alternatively hospitalized in hematology intensive care unit and at home, *Indoor Air*, 2014
- **Steffi ROCCHI**, Gabriel REBOUX, Victor FROSSARD, Emeline SCHERER, Benoit VALLOT, Audrey LABOISSIERE, Mallory VACHEYROU, François GILLET, Sandrine ROUSSEL, Chantal RAHERISON, Laurence MILLON and the ELFE team, Microbiological characterization of 3193 French dwellings of ELFE cohort children, soumis à *Environmental International*

1.2. Publications liées à la thèse

- Laurence MILLON, Fabrice LAROSA, Quentin LEPILLIER, Faezeh LEGRAND, **Steffi ROCCHI**, Etienne DAGUINDEAU, Emeline SCHERER, Anne-Pauline BELLANGER, Joel LEROY, Frederic GRENOUILLET, Quantitative PCR detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients, *Clinical Infectious Disease*, 2013
- Gabriel REBOUX, **Steffi ROCCHI**, Laurence MILLON, Daniel TALON, Xavier BERTRAND, Contamination fongique et bactérienne de 30 salles de consultation de cabinets médicaux en Franche-Comté, *Journal de mycologie médicale*, 2013

1.3. Autre publication

- **Steffi ROCCHI**, Gabriel REBOUX, Modèle expérimental invertébré et bioluminescence : de nouvelles voies pour accroître l'efficacité de l'expérimentation animale, ANSES, Bulletin de veille scientifique n°24, Santé/Environnement/Travail, Juillet 2014

2. Communications scientifiques

- **Steffi ROCCHI**, Anne-Pauline BELLANGER, Fabrice LAROSA, Eric DECONINCK, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON, Risque Fongique des patients immunodéprimés au retour à domicile, Forum des Jeunes Chercheurs DIJON, juin 2011
- **Steffi ROCCHI**, Anne-Pauline BELLANGER, Fabrice LAROSA, Eric DECONINCK, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON, Risque Fongique des patients immunodéprimés au retour à domicile, 6 Décembre 2011 : 1er prix de la Société de Biologie de Besançon
- **Steffi ROCCHI**, Anne-Pauline BELLANGER, Fabrice LAROSA, Eric DECONINCK, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON, Risque Fongique des patients immunodéprimés au retour à domicile, Société Française de Mycologie Médicale, 9-10-11 mai 2012, Rennes, Prix Jeune Chercheur Guy Voisard
- **Steffi ROCCHI**, Anne-Pauline BELLANGER, Fabrice LAROSA, Eric DECONINCK, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON, Risque Fongique des patients immunodéprimés au retour à domicile, Séminaire des doctorants Chrono-Environnement, 14 décembre 2012, Besançon
- **Steffi ROCCHI**, Anne-Pauline BELLANGER, Fabrice LAROSA, Eric DECONINCK, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON, Risque Fongique des patients immunodéprimés au retour à domicile, Société de Médecine de Franche-Comté, session médecine générale, 26 septembre 2013, Besançon
- **Steffi ROCCHI**, Gabriel REBOUX, Anne-Pauline BELLANGER, Fabrice LAROSA, Emeline SCHERER, Etienne DAGUINDAU, Ana BERCEANU, Eric DECONINCK, Laurence MILLON, Evaluation of fungal risk for immunocompromised patients alternatively hospitalized in haematology ICU and at home, TIMM 2013, octobre 2013, Copenhagen, ECMM Young Investigators Travel Award (poster)

- **Steffi ROCCHI**, Gabriel REBOUX, Fabrice LAROSA, Emeline SCHERER, Etienne DAGUINDAU, Ana BERCEANU, Eric DECONINCK, Laurence MILLON, Anne-Pauline BELLANGER, Risque fongique des patients immunodéprimés au retour à domicile, EDMA 14-15 novembre 2013, Besançon
- **Steffi ROCCHI**, Emeline SCHERER, Benoît VALOT, Audrey LABOISSIERE, Sandrine ROUSSEL, Mallory VACHEYROU, Bénédicte LAENERT, Marie-Aline CHARLES, Chantal RAHERISON, Laurence MILLON, Gabriel REBOUX, Consortium ELFE, Étude Longitudinale Française depuis l'Enfance : bilan microbiologique de 3217 logements et état de santé des enfants à la naissance, EDMA 14-15 novembre 2013, Besançon
- **Steffi ROCCHI**, Etienne DAGUINDAU, Frédéric GRENOUILLET, Eric DECONINCK, Anne-Pauline BELLANGER, Déa GARCIA-HERMOSO, Stéphane BRETAGNE, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON, Aspergillose invasive due à une souche résistante d'*Aspergillus fumigatus* portant la mutation TR34/L98H chez un agriculteur français, Société Française de Mycologie Médicale, 29-30 novembre 2013, Paris (poster)
- **Steffi ROCCHI**, Etienne DAGUINDAU, Frédéric GRENOUILLET, Eric DECONINCK, Anne-Pauline BELLANGER, Déa GARCIA-HERMOSO, Stéphane BRETAGNE, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON, Aspergillose invasive due à une souche résistante d'*Aspergillus fumigatus* portant la mutation TR34/L98H chez un agriculteur français, Journée Des Doctorants chrono-environnement, 13 décembre 2013, Besançon

INTRODUCTION

Pollution intérieure, intérêt de la mesure des micro-organismes

INTRODUCTION

1. Problématique et législation concernant la pollution de l'air intérieur

La pollution de l'air intérieur fait l'objet d'une préoccupation grandissante depuis quelques années. En effet, la part de notre temps passée à l'intérieur d'espaces clos (logements, lieux de travail, écoles, véhicules...) est estimé à 90%: 50% dans les habitations et 30% dans les lieux de travail. L'intérieur constitue donc aujourd'hui le premier environnement de l'homme. Compte tenu de ces observations et étant donné la multitude de polluants possiblement retrouvés dans les bâtiments, la problématique de la qualité de l'air intérieur est devenue une importante question de santé publique. D'autre part, les scientifiques et les médecins évoquent de plus en plus les risques sanitaires liés à la dégradation de la qualité de l'air intérieur. Récemment l'organisation mondiale de la santé (OMS) a d'ailleurs déclaré lors d'un communiqué de presse (le 25 mars 2014) que 4,3 millions de décès prématurés seraient liés à la pollution de l'air intérieur.

En France, cette préoccupation grandissante a amené à la mise en place de différentes mesures ces dernières années. Des textes réglementaires des années 80-90 évoquaient déjà la prévention des risques professionnels et la nécessité des contrôles d'installation des systèmes d'aération des locaux professionnels par exemple (Arrêtés des 8 et 9 octobre 1987, Loi du 31 décembre 1991 du code du travail). Au début des années 90 sont apparus les premiers bâtiments haute qualité environnementale qui se concentrent entre autres sur la qualité sanitaire de l'air avec la santé et le confort des usagers. Depuis 1996, une directive européenne (96/62/CE) demande aux états membres de mettre en place une politique d'évaluation et de gestion de la qualité de l'air ambiant. L'observatoire de la qualité de l'air intérieur (OQAI) a été créé en 2001 suite au plan national santé environnement: les pouvoirs publics ont ainsi chargé l'OQAI d'étudier la pollution de l'air intérieur. A partir de 2010, certaines substances classées cancérigènes, mutagènes ou reprotoxiques ont été interdites. Depuis 2011, "une surveillance de la qualité de l'air est obligatoire pour le propriétaire ou l'exploitant de certains établissements recevant du public..." (Art. L221-8 du code de l'environnement). Plus récemment, depuis le 1er janvier 2012, un étiquetage relatif aux émissions de composés organiques volatiles (COV) des produits de construction, de revêtement des murs, des meubles et des éléments de décoration est imposé. La surveillance périodique des établissements accueillant du public se renforce et deviendra obligatoire dans les prochaines années: avant le 1^{er} janvier 2015 pour les établissements d'accueil collectif d'enfants de moins de six ans et les écoles maternelles, avant le 1^{er} janvier 2018 pour les écoles élémentaires, avant le 1^{er} janvier 2020 pour les accueils de loisirs et les établissements d'enseignement ou de formation professionnelle du second degré, avant le 1^{er} janvier 2023 pour les autres établissements.

INTRODUCTION

Certains polluants intérieurs sont aujourd'hui mieux connus et certaines doses d'exposition ont pu être définies comme étant toxiques pour les personnes. Depuis 2004, les travaux de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) visent en effet à établir des valeurs guides de qualité de l'air intérieur. Ainsi, des valeurs guides de l'air intérieur ont été définies par les pouvoirs publics pour certains polluants comme le formaldéhyde et le benzène (Décret n° 2011-1727 du 02/12/11 : valeurs guides de 30 µg/m³ au 1^{er} janvier 2015 pour le formaldéhyde et 5 µg/m³ au 1^{er} janvier 2013 pour le benzène). Mais les mesures mises en place jusqu'à ce jour s'intéressent surtout aux polluants chimiques (dioxyde d'azote, plomb, benzène, formaldéhyde, monoxyde de carbone...).

Or, nous sommes également exposés à de nombreux bioaérosols tels que les allergènes, les mycotoxines, les endotoxines, les composés microbiologiques ou les micro-organismes eux-mêmes, qu'ils soient vivants ou morts. Nous partageons en effet nos habitations avec de nombreux micro-organismes (moisissures, bactéries, acariens), compatibles avec nos vies à l'intérieur. Ils sont effectivement adaptés à nos conditions de vie en termes de température et d'humidité et se nourrissent de nos éléments d'ameublement, de nos aliments ou de nos squames... Ces micro-organismes, leurs composants ou leurs produits métaboliques peuvent également entraîner différents effets sur notre santé, même si l'habitat ne possède pas les critères habituels d'insalubrité. Tout d'abord "oubliés", les polluants biologiques commencent de plus en plus à être évoqués. La loi SRU (solidarité et renouvellement urbain) créée en 2000 s'intéresse à la question du logement décent et de l'habitat insalubre. Lorsque que l'occupant d'un logement estime que celui-ci peut présenter un risque pour sa santé, il peut solliciter la direction départementale des affaires sanitaires et sociales ou le service communal d'hygiène et de santé de sa ville (Boutin-Forzano et al., 2006). La perception par les populations du risque sanitaire lié aux moisissures s'est d'ailleurs accrue ces dernières années: les services administratifs et sociaux français assistent en effet à une augmentation des plaintes pour logements insalubres. En 2003, un groupe de travail "Moisissures dans l'habitat" au sein du conseil supérieur d'hygiène publique de France a été créé (Arrêté du 22 mai 2003). L'OQAI encourage depuis 2009 le développement de la profession des conseillers médicaux en environnement intérieur (CMEI) (action n°23 ; article 40 de la loi du 3 août 2009 de programmation relative à la mise en place du Grenelle de l'environnement) qui mesurent également, sur prescription médicale, l'exposition aux micro-organismes. Enfin, des groupes de travail et des comités d'experts spécialisés (« Evaluation des risques liés aux milieux aériens » par exemple) ont notamment été créés à l'ANSES.

INTRODUCTION

2. Logements et problèmes d'humidité

Depuis la crise pétrolière de 1973, les pays industrialisés se sont tournés vers une politique d'économie d'énergie. Un phénomène d'accroissement d'humidité au sein des logements, favorable au développement des micro-organismes, a ainsi été observé suite à la réduction des températures dans les habitats et aux problèmes d'isolation et de ventilation. A cela s'ajoutent les défauts de construction qui peuvent entraîner des phénomènes d'infiltration, les dégâts des eaux (fuites et inondations), les remontées d'humidité et l'occupation humaine. En effet, la respiration, les activités humaines telles que la lessive et la cuisine ou encore la multiplication des équipements ménagers (lave-vaisselle, machine à laver, sèche-linge) génèrent d'avantage d'humidité. Ceci, couplé à une mauvaise ventilation dans des logements que l'on voulait le plus hermétique possible il y a quelques années, pose aujourd'hui de nombreux problèmes.

En France, différentes études montrent que 20 à 50% des logements présenteraient des problèmes d'humidité et de contaminations aux moisissures (Boutin-Forzano et al., 2006; Host et al., 2010; Lalande, 2010). Ces problèmes d'humidité et de moisissures sont visiblement également retrouvés dans 10 à 50% dans les pays riches (Tableau 1). Mais ces cas étant souvent rapportés par les occupants eux-mêmes, la prévalence exacte du nombre de logements touchés est inconnue.

Tableau 1 : Logements présentant des problèmes d'humidité

PAYS	POURCENTAGE DE LOGEMENTS	RÉFÉRENCES
Pologne	50%	(Kaszniak-Kocot et al., 2010) (Gunnbjörnsdóttir et al., 2006)
Pays-Bas	15-18%	
Pays Nordiques	15-25%	
Angleterre	17-46%	
Amérique du Nord	15-50%	(Sivasubramani et al., 2004) (Mudarri and Fisk, 2007)
Europe du Nord		
Russie	25%	(Spengler et al., 2004)

Ces problèmes d'humidité semblent donc toucher de nombreux logements et peuvent être à l'origine du développement de micro-organismes.

INTRODUCTION

3. Micro-organismes de l'environnement intérieur

3.1. Moisissures

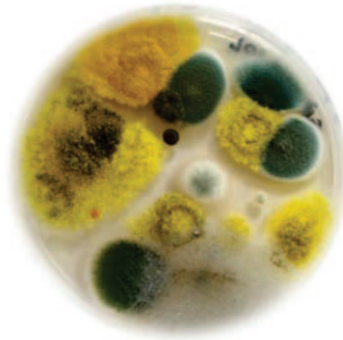


Figure 1 : Moisissures sur milieu DG18

Les moisissures, champignons microscopiques filamenteux (ascomycètes, deutéromycètes, mucorales) ou levuriformes (ascomycètes, basidiomycètes), font partie de l'un des trois règnes d'organismes vivants eucaryotes : l'ordre des mycètes (Eumycota). Ce règne, qui comporte 60 000 à 120 000 espèces selon les auteurs, a été estimé à 1,5 millions d'espèces dans les années 90 (Hawksworth, 2001). Démunis de chlorophylle, les moisissures hétérotrophes doivent puiser leurs ressources dans l'environnement. Elles présentent trois modes de nutrition possibles :

- Le saprophytisme lorsqu'elles se développent aux dépens de matière organique en décomposition ou de matières animales chitineuses (ongles, cheveux).
- Le parasitisme lorsque la matière organique est puisée dans organismes vivants (animaux ou végétaux).
- La symbiose lorsqu'il existe une association bénéfique et réciproque avec d'autres micro-organismes.

Les moisissures sont ubiquistes et colonisent une grande diversité d'habitats. La plupart se dispersent sous forme de spores sexuées ou asexuées facilement aérosolisables à partir d'organes reproducteurs spécialisés. Leur croissance dépend de la nature des substrats et des conditions physiques (disponibilité en eau, température, oxygène, pH). Une fois déposées dans l'environnement les spores germent en 24 heures dans des conditions de développement propices. S'ensuit alors, dans les 48-72 heures, le développement des hyphes, du mycélium et des structures conidiogènes qui larguent à leur tour de nouvelles spores. Un nombre important de spores est produit par chaque colonie de moisissures. Ces spores sont ensuite véhiculées par l'air, l'eau, les acariens, les insectes, les hommes et ont donc un pouvoir de diffusion considérable. De plus, leur paroi riche en chitine leur permet de résister aux contraintes extérieures et la présence de protéines hydrophobes (hydrophobines) favorise leur dispersion dans l'air (Bayry et al., 2012).

INTRODUCTION

Ces moisissures proviennent au départ de l'environnement extérieur (des sols et des végétaux) mais sont capables de se développer dans nos habitats. La plupart des produits de construction et de décoration à l'intérieur des logements peuvent en effet être colonisés par les moisissures. Elles y trouvent des substrats propices à leur développement : les plâtres, les papiers peints, les peintures, le bois, le mobilier qui leur apportent les nutriments dont elles ont besoin (oxygène, carbone, hydrogène, phosphore...). Les moisissures peuvent même être retrouvées sur des substrats non biodégradables comme les substrats minéraux et en céramique (Figure 2).

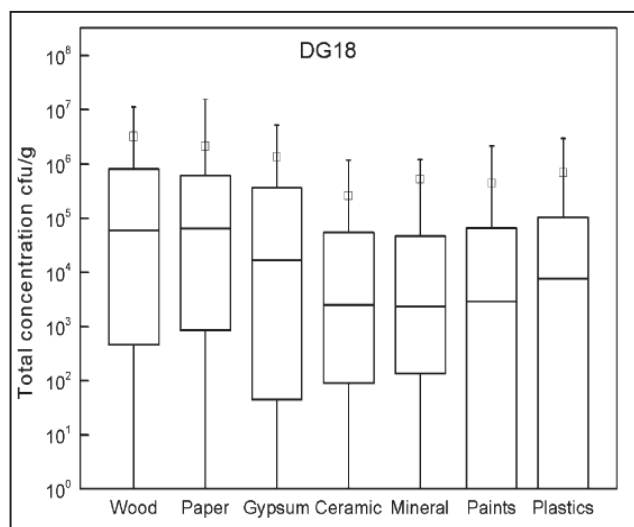


Figure 2 : Distribution des moisissures viables totales (milieu Dichloran Glycerol 18% de glycérol (DG18)) sur 7 types de matériaux retrouvés dans les habitations. Les résultats sont exprimés en Unité Formant Colonies (UFC) /g de matériel humide. (Hyvärinen et al., 2002)

Les moisissures les plus retrouvées dans l'environnement intérieur en France appartiennent aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*. Les concentrations de spores retrouvées dans l'air intérieur sont variables mais elles restent en moyenne inférieures à ce qui peut être décompté dans l'air extérieur. Des abondances plus importantes de spores sont en général retrouvées dans les milieux agricoles et industriels et la majorité des spores fongiques présente des pics de concentration durant l'été.

D'autres composés fongiques, composants cellulaires (glucanes, fragments) ou issus de leur métabolisme (COV, mycotoxines) peuvent être retrouvés également dans les logements.

INTRODUCTION

3.2. Acariens

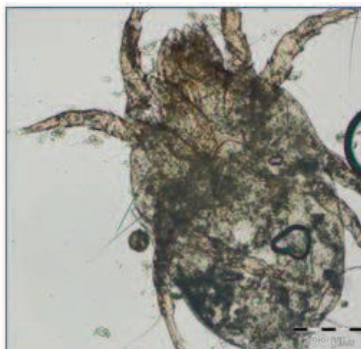


Figure 3 : *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Photographie A. Naegele).

Les acariens sont des invertébrés à carapace qui possèdent huit pattes articulées : Ils font partie de l’embranchement des arthropodes et de la classe des arachnides. Parmi les 50 000 espèces d’acariens retrouvées dans le monde, celles retrouvées dans les logements ne rassemblent qu’une minorité (Bessot and Pauli, 2011). *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae* sont les deux espèces communes d’acariens rencontrées dans les logements. Ils vivent dans la poussière accumulée dans les tapis et la literie. Des acariens de stockage comme *Acarus siro*, initialement considérés comme uniquement reliés au secteur agricole, peuvent également être rencontrés dans les cuisines des logements. Tout comme les moisissures, les acariens jouent un rôle dans la décomposition et le recyclage de la matière organique et notamment celle de l’homme. Pour se reproduire, ils nécessitent un important taux d’humidité. Il n’est donc pas étonnant qu’ils partagent le même habitat que les moisissures (Charpin et al., 2010), d’autant plus que les acariens peuvent s’en nourrir (Naegele et al., 2012). Leur cycle biologique passe par différents stades : œuf, larves, nymphes et adultes. Dans des conditions contrôlées (75 à 80% d’humidité et 25 à 30°C) *D. pteronyssinus* met 3 à 4 semaines pour passer de l’œuf à l’adulte. Les adultes vivent ensuite 4 à 6 semaines et les femelles pondent 40 à 80 œufs (Colloff, 2009).

INTRODUCTION

3.3. Bactéries

Nous ne nous focaliserons dans ce manuscrit que sur trois familles de bactéries qui peuvent être impliquées dans les pathologies respiratoires allergiques: les actinobactéries, les entérobactéries et les mycobactéries.

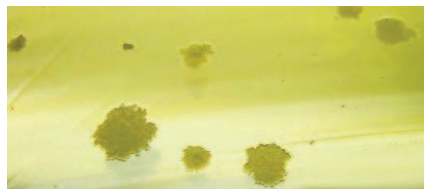


Figure 4 : *Mycobacterium immunogenum* (milieu Muller Hilton). (Photographie : J.B. Murat)

Les actinobactéries sont des bactéries du sol, gram positif, qui forment des spores et des mycéliums comme les moisissures et qui se trouvent également dans les logements. *Streptomyces* spp. (actinomycètes) peut par exemple se développer sur des matériaux humides et mouillés (Hyvärinen et al., 2002) comme le font les moisissures (Figure 5) et peut aussi être retrouvé dans la poussière (Rintala et al., 2004).

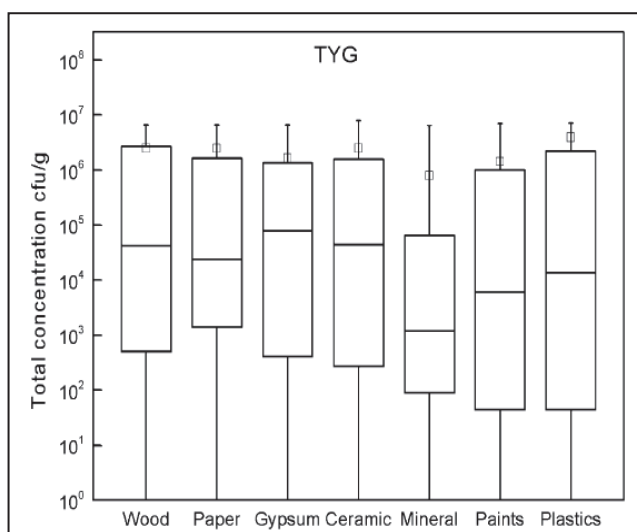


Figure 5 : Distribution des actinobactéries viables totales (milieu tryptone yeast extract glucose) sur 7 types de matériaux retrouvés dans les habitations.

Les résultats sont exprimés en UFC/g de matériel humide. (Hyvärinen et al., 2002)

Les entérobactéries (*Klebsiella* spp. et *Enterobacter* spp.) sont des bactéries gram négatif (comme *Pseudomonas* spp.) et ont des parois constituées d'endotoxines, qu'elles libèrent lors de leur lyse ou dans une moindre mesure lors de leur multiplication. Ces bactéries étant omniprésentes, leurs endotoxines sont également retrouvées dans l'environnement. Bien qu'il n'y ait pas d'association

INTRODUCTION

clairement identifiée, les endotoxines ont été retrouvées dans des logements ayant des problèmes d'humidité, témoignant ainsi de la présence des bactéries gram négatif (Solomon et al., 2006; Sordillo et al., 2011). Des associations entre endotoxines et bactéries de gram négatif dans des logements ont d'ailleurs récemment été mis en évidence (Adhikari et al., 2014).

La famille des mycobactéries possède un seul genre : *Mycobacterium*. Ces mycobactéries sont également retrouvées dans des logements présentant des problèmes d'humidité et serait partiellement dues à la présence des hommes et des animaux (Kettleson et al., 2013).

4. Effets sur la santé

L'impact et le niveau de preuve de l'implication des organismes de l'environnement intérieur varient largement selon les pathologies, les régions et le type d'études. De par la petite taille de leurs spores, les moisissures peuvent atteindre les voies respiratoires, et dans certains cas, entraîner des effets sur la santé (Kuhn and Ghannoum, 2003). Les modes d'action des moisissures et leurs effets dépendent des espèces présentes, de leur concentration, de la durée d'exposition et du type de personne exposée (Seltzer and Fedoruk, 2007).

4.1. Effet infectieux

Les moisissures peuvent être responsables d'infections comme les mycoses invasives touchant plus particulièrement les personnes immunodéprimées. L'infection fongique invasive (IFI) la plus fréquente est l'aspergillose invasive (AI) et représente l'infection la plus préoccupante en hématocancérologie. Les espèces impliquées, thermophiles, dites opportunistes, comme *Aspergillus fumigatus*, peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires et coloniser les patients. Les patients les plus concernés sont ceux d'onco-hématologie (atteints de leucémies aiguës, lymphomes), les patients transplantés (greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH), greffe d'organe solide) ou porteurs d'un sida évolué (Kontoyiannis and Bodey, 2002).

Ces patients reçoivent en effet des chimiothérapies intensives et/ou des traitements corticoïdes et immunosuppresseurs. Les mycoses invasives surviennent surtout lors de neutropénies profondes (nombre de polynucléaires neutrophiles (PNN) inférieur à $500/\text{mm}^3$ de sang) et prolongées (supérieures à 15 jours). Les infections fongiques systémiques sont en augmentation depuis les deux dernières décennies. En effet, par l'amélioration de la prise en charge des patients atteints d'hémopathies, l'augmentation du nombre de greffes de CSH et l'utilisation de traitements

INTRODUCTION

immunosuppresseurs agressifs, la survie des patients est prolongée mais s'accompagne d'un risque majeur d'infections fongiques opportunistes (Latgé, 1999).

L'incidence mondiale des AI est estimée à 200 000 personnes / an représentant 1,5 à 10% du million de patients à risque fortement immunodéprimés (Brown et al., 2012). Bien que les chances de survie des patients se soient améliorées ces dernières années, les AI, et plus généralement les IFI, sont des causes majeures de mortalité chez les patients à risque. La mortalité est estimée supérieure à 50% chez les patients neutropéniques et jusqu'à 90% chez ceux ayant une greffe de CSH. Bien que l'incidence des IFI dépende principalement de l'état d'immunodépression du patient et de ses traitements, elle dépend aussi de son exposition aux moisissures de l'environnement (Bénet et al., 2007).

A. fumigatus, omniprésent dans l'environnement, est l'agent étiologique principal de la plupart des AI. Mais d'autres *Aspergillus* peuvent également être impliqués comme *A. flavus*, et plus rarement *A. nidulans*, *A. terreus* et *A. niger* (Latgé, 2001; Reboux et al., 2010). D'autres genres de moisissures sont également impliqués dans des IFI. L'ordre des Mucorales, regroupant *Lichtheimia* (*Absidia*) *corymbifera*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus* spp. et *Rhizomucor* spp., est susceptible d'entraîner des mucormycoses. *Fusarium solani*, fréquemment retrouvé dans le sol, l'eau et les débris de plantes (Zhang et al, 2006), est aussi responsable de mycoses graves, appelées fusarioses, chez les grands brûlés et les immunodéprimés. *Scedosporium prolificans* peut également être responsable de mycose invasive. Quelques rares espèces d'*Acremonium* sont aussi capables de se développer à 37°C (Reboux et al., 2010) et peuvent entraîner des infections fongiques opportunistes.

4.2. Effets immunologiques

Les moisissures sont également impliquées dans des pathologies allergiques, dont la plus fréquente est l'asthme. Elles ont en effet été reliées à des allergies immédiates de type IgE médiées ou des allergies plus chroniques avec des anticorps IgG. La méta analyse de Fisk (Fisk et al., 2007) a montré que les logements présentant des problèmes d'humidité et de contamination aux moisissures étaient associés à une augmentation de 30 à 50% des phénomènes respiratoires, dont l'asthme. Les éléments constitutifs des spores ou du mycélium (protéines et polysaccharides) des moisissures peuvent en effet constituer des allergènes (Husman, 1996) et entraîner des maladies immuno-allergiques. Certains polysaccharides extracellulaires, excrétés durant la croissance cellulaire ont visiblement également des propriétés antigéniques. De nombreux auteurs s'intéressent donc aux moisissures dans les logements et aux problèmes respiratoires qui en découlent. Certains genres de

INTRODUCTION

moisissures comme *Aspergillus* (Agarwal and Gupta, 2010), *Alternaria* (Salo et al., 2006), *Penicillium* (Bundy et al., 2009), *Cladosporium* (Garrett et al., 1998) ont été décrits comme producteurs d'allergènes et induisant des pathologies respiratoires allergiques.

Des revues de la littérature rapportent le lien existant entre humidité/présence de moisissures et problèmes respiratoires. La méta-analyse de Tischer et al. (Tischer et al., 2011b) faisant le bilan sur 8 cohortes européennes d'enfants, montre qu'il y a une association significative de l'asthme à 3 ans avec une exposition précoce de l'enfant à l'humidité et aux moisissures. Dans son rapport de 2009, l'OMS annonce que l'occupant d'un logement humide et/ou moisi, aurait 75% de risque en plus d'avoir des symptômes respiratoires (OMS, 2009). D'autres études (polonaise, italienne, suédoise) suggèrent que de forts niveaux de contaminations en spores de moisissures dans les logements peuvent induire des augmentations dans la prévalence des symptômes allergiques tel que les sifflements, la dyspnée et l'asthme (Bornehag et al., 2004; Jacob et al., 2002; Kasznia-Kocot et al., 2010; Simoni et al., 2005). Des phénomènes de sensibilisation à *Cladosporium*, *Alternaria* et *D. pteronyssinus* seraient également associés à la sévérité de l'asthme (Zureik et al., 2002). Trois à 10% de la population mondiale présenteraient des réactions allergiques vis-à-vis des moisissures (Hamilos, 2010). D'autres micro-organismes comme *Aureobasidium* spp. ont été associés à des rhinites allergiques chez des enfants (Stark et al., 2005).

L'allergie aux acariens est l'allergie la plus fréquente. Les déjections des acariens, mesurant 20 à 50µm, sont également accumulées dans les poussières des logements. Ces fèces contiennent de grandes quantités d'enzymes, résultant de la digestion, qui sont des allergènes. Le premier allergène qui a été identifié, retrouvé principalement dans les fèces de *D. pteronyssinus*, est Der p 1. En laboratoire, une étude a montré que *D. pteronyssinus* produisait en moyenne 20 déjections par jour, qui contenait 100pg de Der P1 chacune (Tovey et al., 1981). Des seuils de sensibilisation fixés à 2µg/g de poussière ont été établis comme entraînant la production d'anticorps (Platts-Mills et al., 1997). D'autres allergènes d'acariens retrouvés dans les déjections ont également été décrits, comme la guanine, détectée dans l'Acarex-test.

Les bactéries peuvent également intervenir dans les effets allergiques. Les actinomycètes, formant des spores, sont des sources d'allergènes impliquées dans les maladies respiratoires (Douwes et al., 2003). Les actinomycètes thermophiles comme *Saccharopolyspora rectivirgula* et *Thermoactinomyces vulgaris* notamment retrouvés dans le foin, ont été décrits comme étant des allergènes impliqués dans la pneumopathie d'hypersensibilité de la maladie du poumon de fermier (Reboux et al., 2001).

INTRODUCTION

Mycobacterium spp. (Mycobactérie) est connu pour être impliqué dans les pneumopathies d'hypersensibilités d'origine professionnelle. *M. immunogenum* est impliqué dans le poumon de mécanicien (Tillie-Leblond et al., 2011) et *M. avium* est impliqué dans le poumon de jacuzzi (Embil et al., 1997) ou dans des simples cas de d'utilisation de douches et de baignoires (Hankwitz et al., 2011).

Les bactéries et les moisissures peuvent également être responsables d'effets allergiques avec colonisation. C'est le cas notamment des patients atteints de mucoviscidose. La mucoviscidose, ou fibrose kystique, est la principale maladie génétique retrouvée en Europe (Pihet et al., 2009) et est la 3^{ème} maladie orpheline en France. Ces patients peuvent être colonisés par des bactéries telles que *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* mais également par des champignons filamenteux tels que *Aspergillus* spp., *Scedosporium apiospermum* ou *Exophiala dermatitidis*. Chez ces patients atteints de mucoviscidose, *A. fumigatus* peut entraîner différentes pathologies incluant la bronchite, l'asthme, l'aspergillome ou encore des infections pulmonaires invasives après des greffes de poumons. Mais c'est l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), dont l'agent étiologique est *A. fumigatus* qui est rencontrée dans la plupart des cas.

4.3. Effets irritatifs et toxiques

Différents composés constitutifs des moisissures et des bactéries ou excrétés par ces microorganismes peuvent également entraîner des phénomènes toxiques et irritatifs.

Les mycotoxines, métabolites secondaires produits par certaines moisissures, dans certaines conditions, sont des composés chimiques de faible poids moléculaire (Bush et al., 2006) qui leur procurent un avantage de croissance vis-à-vis des autres micro-organismes. Elles sont retrouvées principalement dans les graines, les céréales, les noix et les produits animaux incluant la viande, les œufs et le lait. Une fois ingérées, elles peuvent entraîner différents effets (hépatotoxiques, neurotoxiques, mutagènes, tératogènes et carcinogènes) chez l'homme et les animaux. Certaines moisissures comme *Penicillium*, *Aspergillus*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* et *Chaetomium* ont été décrites comme pouvant produire des mycotoxines dans l'habitat (Seltzer and Fedoruk, 2007). *Stachybotrys charatum*, moisissure la plus toxigénique, serait par exemple impliquée dans le syndrome du "malaise lié à l'habitat" (ou "sick building syndrom" : SBS) qui entraîne des symptômes non spécifiques comme une irritation des muqueuses, des maux de tête ou encore de la fatigue (Kuhn and Ghannoum, 2003).

INTRODUCTION

Les spores et les fragments d'hyphes, de par leur composition en glucanes et mananes, ont des propriétés irritatives. Les β -1,3-glucanes sont des polymères de glucose de haut poids moléculaire, non solubles, présents dans les parois de la plupart des moisissures et de certaines bactéries. Ces composants essentiels de la paroi, représentant 60% du poids de la paroi cellulaire (Tischer et al., 2011a), sont connus pour leurs effets irritants. Ces composés sont impliqués dans des processus inflammatoires (production d'IgG) (Latge, 2010).

La présence de composés bactériens comme les peptidoglycanes (majoritairement retrouvés chez les bactéries gram positif) ou encore les endotoxines (retrouvées uniquement chez les bactéries gram négatif) ont été reliés à des symptômes respiratoires. L'exposition et les effets des endotoxines, produites par les entérobactéries, ont largement été étudiés, notamment dans les milieux professionnels. L'inhalation d'endotoxines, composées de lipopolysaccharides, à forte dose, déclenche une réponse inflammatoire pulmonaire suivie de symptômes respiratoires (Heederik and von Mutius, 2012). L'INRS a d'ailleurs publié en 2011 un dossier médico-technique "Endotoxines en milieu de travail" et rapporte notamment la valeur limite d'exposition aux endotoxines au travail, définie aux Pays-Bas, qui est de 90 Unités d'Endotoxines (UE) par m³ d'air (10 UE = 1 ng). Une contamination aux endotoxines supérieure à 100 UE/mg dans la poussière domestique a été décrite comme associée à une augmentation de 29% des phénomènes de respiration sifflante chez des enfants d'un an (Park et al., 2001).

Enfin, les COV fongiques, responsables de leur odeur de moisi, peuvent également entraîner, comme les autres COV, des effets irritants (OMS, 2009).

4.4. Autres effets des microorganismes

Quelques rares études épidémiologiques se sont intéressées à l'exposition aux biocontaminants et au développement cognitif de l'enfant. La cognition est un terme qui rassemble les grandes fonctions de l'esprit telle que la perception, le langage, la mémoire, la décision, le mouvement. Certaines capacités cognitives de l'enfant se mettent en place dans la période prénatale. Par exemple, le nourrisson est capable dès la naissance, de reconnaître l'odeur de sa mère. A la naissance, le cerveau est encore très immature et vulnérable. L'enfant est alors l'objet de stimuli intenses, qu'il doit apprendre à gérer.

L'étude de Jedrychowski (Jedrychowski et al., 2011) suggère qu'une exposition aux moisissures dans l'environnement intérieur lors du début de vie des enfants a une action sur leur développement cognitif à 6 ans. Une étude allemande a mis en évidence une augmentation des problèmes de

comportements et d'émotion chez des enfants de 10 ans qui avaient été exposés à des moisissures visibles dans l'environnement intérieur, des problèmes d'humidité et des animaux de compagnie (Casas et al., 2013a). Cette même dernière équipe a montré dans une autre étude (Casas et al., 2013b) qu'une exposition prolongée à l'humidité intérieure pendant les premiers jours de la vie avait des effets négatifs sur les fonctions cognitives de l'enfant à 4 ans. Des études expérimentales ont également suggéré que l'activation immunitaire prénatale ou dans les premiers jours de la vie, par le biais des endotoxines, peut inhiber la neurogénèse et que cette exposition à l'âge adulte conduit à des sautes d'humeur et des troubles cognitifs (Eisenberger et al., 2010).

4.5. Effets controversés

De nombreux effets sur la santé ont ainsi été décrits. L'effet des micro-organismes dans les pathologies infectieuses est évident. Pour les pathologies allergiques, l'identité des espèces en cause est mal connue. Pour les deux types de pathologie, infectieuse et allergique, les seuils de concentration associés à un risque en milieu domestique ne sont pas encore établis. Et bien que les effets des micro-organismes sur les pathologies allergiques, irritatives et toxiques, notamment dans les logements insalubres, soient à ce jour de plus en plus documentés, les mécanismes mis en jeu sont mal connus (Seltzer and Fedoruk, 2007).

Bien que de nombreuses études rapportent le fait que des enfants vivant dans des logements humides et contaminés par les moisissures aient un risque plus accru de développer des pathologies respiratoires, la relation entre quantité inhalée et apparition des symptômes allergiques reste toutefois inconnue et controversée (Kasznia-Kocot et al., 2010).

Certains auteurs contredisent en effet nettement ces constats. Dans leur publication, Bush et al (Bush et al., 2006) rapportent que parmi les 10% de la population possédant des IgE dirigés contre les moisissures inhalées les plus courantes, seulement 5% ont des symptômes allergiques. Cette même publication avance la possible confusion de l'effet de certains autres allergènes irritants comme les pollens et les poils d'animaux avec l'effet des moisissures.

Certains auteurs sont même partisans d'une théorie complètement inverse : Les micro-organismes de l'environnement intérieur pourraient avoir des effets bénéfiques sur les pathologies respiratoires (von Mutius, 2007). L'hypothèse avancée est que le développement des poumons et du système immunitaire se passerait surtout *in utero* et dans les premières années de la vie et que l'exposition à l'environnement dans ces deux périodes aurait une influence. L'exposition aux micro-organismes dans les premiers mois de la vie entrainerait la différenciation des lymphocytes en Th1 (au lieu de

INTRODUCTION

Th2), ce qui induirait une protection contre les réactions allergiques (Kasznia-Kocot et al., 2010; Lynch et al., 2014).

C'est ainsi, que dans les années 1990 est née la théorie hygiéniste supposant que les enfants exposés à des micro-organismes de l'environnement dès leur plus jeune âge développeraient moins d'asthme et de sensibilisations allergiques que les autres. Plusieurs études en Europe (Riedler et al., 2001; Sudre et al., 2009; Vacheyrou et al., 2011; von Mutius, 2007) ont montré que des enfants ayant grandi en côtoyant des fermes, des animaux, du lait non pasteurisé et des boissons fermentées développaient moins d'asthme et de sensibilisation allergiques que des enfants n'ayant pas fréquenté ces environnements. L'exposition intra-utérine de l'enfant aurait également un rôle. Dans le même sens, des enfants fréquentant des crèches développeraient moins d'asthme que les enfants n'y allant pas (Kasznia-Kocot et al., 2010). Dans une étude plus récente (Lynch et al., 2014), l'exposition des enfants durant la première année de leur vie à certaines bactéries de la poussière domestique a également été évoquée comme ayant un rôle protecteur vis-à-vis des sifflements respiratoires à 3 ans. D'autres études ont montré que la présence de β -1,3-glucanes et de polysaccharides extracellulaires était inversement proportionnelle à l'apparition de symptômes respiratoires tels que les sifflements. Ainsi, ces composés fongiques auraient des propriétés stimulantes, comme les endotoxines, sur le développement du système immunitaire dans la période prénatale (Tischer et al., 2011a).

Entre 1993 et 1994, *S. chartarum* a été reconnu comme impliqué dans les décès de bébés à Cleveland (Ohio) suite à des hémosidéroses pulmonaires (premiers cas publiés et cités régulièrement). Mais le "Center of disease control" a par la suite modéré ses premières conclusions car l'effet de *Stachybotrys* n'avait pas été prouvé. Certains auteurs affirment que les doses d'exposition aux mycotoxines dans les logements sont trop faibles pour entraîner des effets lors de leur inhalation, contrairement à ce qui peut être ingéré avec les aliments (Seltzer and Fedoruk, 2007).

De la même façon, il est toujours difficile de savoir si un syndrome comme celui du SBS est bel et bien le fruit d'une exposition à des polluants, qu'il s'agisse de micro-organismes ou de composés chimiques ou s'il est le résultat d'un syndrome psychogène. Des études soulèvent cette interrogation : Une étude publiée en 2004 (Handal et al., 2004) a montré qu'une fois que des problèmes de contamination aux moisissures dans les écoles étaient médiatisés, la perception des symptômes chez les enfants augmentait. La plupart du temps, il n'y a pas d'investigation sur les autres causes possibles pouvant entraîner le SBS. Le questionnement sur les syndromes psychogènes fait d'ailleurs l'objet du bulletin épidémiologique hebdomadaire publié par l'institut de veille sanitaire (INVS) le 24 avril 2007. La seule caractéristique commune dans ces épidémies semble en

effet être l'association systématique de symptômes non spécifiques et de la présence de personnes dans des bâtiments, les causes et la propagation du phénomène collectif restant inexpliqués (Marchand et al., 2010).

5. Différentes techniques de prélèvements et d'analyses

L'évaluation de la contamination dans un logement varie en fonction des types de prélèvement et d'analyses (Verhoeff et al., 1994). Chacune des techniques couramment utilisées donne effectivement une image d'une réalité qui est différente selon les dispositifs de prélèvements et d'analyse utilisés.

Le prélèvement d'air, largement utilisé, permet d'estimer la contamination fongique de la pièce au moment du prélèvement. Différentes méthodes de prélèvement existent : l'impaction, la filtration et l'aspiration avec un biocollecteur en milieu liquide par exemple. Le prélèvement de surface, par écouvillonnage, boîte contact ou ruban adhésif, permet d'avoir une appréciation des spores déposées sur un substrat durant un laps de temps supérieur à l'instant "t" du prélèvement. Les prélèvements de poussières, par aspiration active de surface, permettent d'estimer l'exposition chronique de la personne. Depuis peu, des dispositifs passifs sont utilisés pour recueillir la poussière dans les logements. Les travaux de Noss et al. (Noss et al., 2008) ont ainsi utilisé des capteurs électrostatiques de poussières (EDC) munis de lingettes électrostatiques captant la poussière qui sédimente naturellement.

L'analyse des prélèvements par culture permet d'avoir une idée de la contamination globale du logement. Cette méthode "traditionnelle", est cependant dépendante des milieux de culture utilisés, ainsi que de la température d'incubation. De plus, le temps de développement des moisissures est long, certaines espèces sans ornementation sont difficilement identifiables, et des compétitions entre espèces et des exigences nutritives différentes peuvent entraîner la non détection de certaines espèces (Millon et al., 2006; Pitkäranta et al., 2008). La culture ne permet pas non plus d'observer les bactéries, les moisissures et les acariens à partir du même prélèvement. De plus, la culture ne met en évidence que des spores viables et ne permettra donc pas à l'expérimentateur de détecter des fragments de micro-organismes qui seraient des allergènes dans une problématique d'asthme par exemple. Bien qu'elle ait ses limites, la culture reste toutefois une approche facilement utilisable (sous condition de disposer des connaissances d'identification nécessaires) pour évaluer la contamination microbiologique dans un logement. Elle reste également irremplaçable pour la mise

INTRODUCTION

au point des nouvelles techniques de biologie moléculaire par exemple, car les souches de micro-organismes sont nécessaires à la validation des méthodes.

La technique de spectrométrie de masse type MALDI-TOF est également en pleine expansion pour l'identification des bactéries et des champignons filamenteux.

La biologie moléculaire, avec des approches de PCR quantitative en temps réel (qPCR), est aujourd'hui très utilisée pour l'identification et la quantification de micro-organismes et permet de palier à certains problèmes rencontrés en culture. Les nouvelles techniques de séquençage haut débit (NGS pour Next-Generation Sequencing) commencent également à être utilisées pour détecter les micro-organismes.

D'autres méthodes sont utilisées pour mesurer des éléments constitutifs de la membrane ou la paroi des moisissures par exemple (ergostérol ou β -1,3-glucanes) ou pour mesurer la production de mycotoxines ou de composés organiques volatiles. La mesure d'exposition aux allergènes dans l'environnement est également mesurée par des outils immunologiques. Les techniques évoquées dans ce dernier paragraphe n'ont pas été utilisées dans le cadre de cette thèse.

Il existe donc un panel de méthodes de prélèvements et d'analyses qui ont toutes des avantages et des inconvénients. Il faut donc adapter les techniques utilisées à la question soulevée. Comme l'illustre Vesper dans sa comparaison des techniques d'étude de moisissures (Vesper, 2011), l'échantillonnage pour identifier une exposition dépend de la question posée. Il cite notamment les 3 exemples suivants :

- Si une maison a subi des inondations, et qu'elle présente de nombreuses surfaces moisies, un échantillonnage n'est pas forcément nécessaire pour se rendre compte du problème d'inondation.
- Si un médecin veut connaître la contamination en *A. fumigatus* dans son service, des prélèvements d'air seront adaptés.
- Enfin, pour évaluer l'exposition chronique d'enfants asthmatiques, les prélèvements de poussières seront plus adaptés.

CONTEXTE / PROBLÉMATIQUE

CONTEXTE / PROBLÉMATIQUE

Les différentes pathologies abordées en introduction dépendent du contexte immunitaire dans lequel se trouve le patient (ou la personne) et de son exposition à l'environnement.

1. Pathologies et système immunitaire

Différents type de pathologies peuvent par exemple être provoquées par *A. fumigatus* (Figure 6) en fonction du statut immunitaire de la personne. A niveau de statut immunitaire égal, les seuils de déclenchement des différentes maladies varient en fonction de l'hôte, de ses éventuels traitements et de son exposition à son environnement.

Nous nous intéresserons dans la suite de ce manuscrit à l'exposition environnementale de personnes à risque de développer trois types de pathologies (en bleu dans la Figure 6) : l'AI, l'ABPA et l'asthme et les autres allergies.

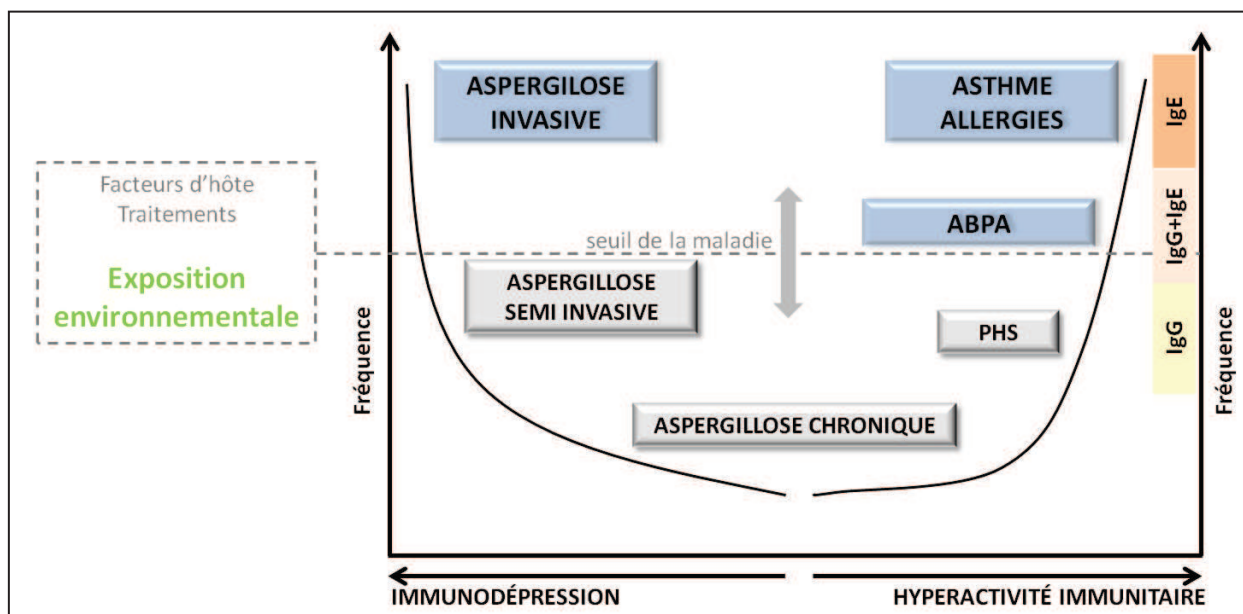


Figure 6 : Principales pathologies aspergillaires en fonction du statut immunitaire de la personne (Denning et al., 2014; Pirofski and Casadevall, 2008).

D'autres micro-organismes avec les mêmes caractéristiques que *A. fumigatus* (thermotolérant pour le risque infectieux, capables d'entraîner une réaction immunitaire pour le risque allergique) pourraient aussi entraîner les mêmes effets que ceux présentés dans la Figure 6.

2. Manque de mesures et manque de standardisation des méthodes pour évaluer l'exposition aux microorganismes

De nombreuses équipes tentent d'évaluer l'exposition aux micro-organismes de l'environnement intérieur et les différents effets/bienfaits sur la santé.

Concernant le risque infectieux, un déséquilibre existe entre les nombreuses mesures prises à l'hôpital (prévention et surveillance environnementale) et l'environnement du logement où seules quelques recommandations sont données au patient lors de sa sortie. La situation des patients atteints de mucoviscidose à risque de développer des mycoses broncho-pulmonaires allergiques (MBPA) est un peu plus évoluée. En effet, des CMEI peuvent être envoyées aux domiciles des patients pour réaliser une enquête environnementale, sans que pour l'instant aucun lien n'ait vraiment pu être établi entre Mycose Broncho-Pulmonaire Allergique (MBPA) et flore fongique au domicile.

Le risque allergique au domicile est beaucoup plus étudié. Mais la plupart des publications mettent en avant des liens de corrélation mais pas de causalité (Seltzer and Fedoruk, 2007). Il apparaît aussi important de ne pas confondre sensibilité et réaction allergique (Denning et al., 2014). Enfin, pour ce qui est des maladies allergiques, que les auteurs soient partisans de la théorie hygiéniste ou non, tous se rejoignent sur le constat du manque de mesure (Tischer et al., 2011a) et de standardisation des techniques de prélèvement et d'analyse (Frankel et al., 2012; Madsen et al., 2012).

Dans la plupart des études portant sur l'exposition aux moisissures et les pathologies respiratoires allergiques, les problèmes de santé sont rapportés par les personnes elles-mêmes ou les parents des enfants (Tischer et al., 2011a). Les glucanes, l'ergostérol ou la chitine sont quelquefois mesurés comme marqueurs d'exposition, mais montrent leur limite dans la mesure où ce sont des méthodes de mesures non spécifiques alors que toutes les espèces n'ont pas les mêmes pouvoirs pathogènes. De plus, outre les difficultés méthodologiques pour quantifier les moisissures, la plupart des travaux réalisant de "véritables" mesures spécifiques, n'étudient qu'un nombre limité de logements.

Une équipe se distingue à ce jour par ses nombreuses publications dans le domaine de l'allergie, avec des mesures standardisées. En effet, les travaux de Vesper et ses collaborateurs mesurent la concentration en ADN fongique contenue dans les poussières des logements. En analysant les poussières, ils mesurent ainsi les moisissures dans un échantillon qui est plus représentatif de l'environnement intérieur que les prélèvements ponctuels d'air. La concentration de 36 moisissures

présentes dans les logements est mesurée au moyen d'une méthode standardisée qui est la qPCR (les séquences des cibles qPCR sont disponibles sur le site de l'Environmental Protection Agency (EPA) <http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm#primers>). Ces 36 cibles qPCR permettent ensuite de calculer un index : l'ERMI (Environmental Relative Moldiness Index). Les 36 cibles sont divisées en deux groupes : 26 moisissures reconnues comme indicatrices de logements moisis (dites du groupe 1) et 10 moisissures communes de l'environnement (dites du groupe 2) (Tableau 2). Cet index est calculé de la façon suivante :

$$\text{ERMI} = \Sigma \log \text{des concentrations du groupe 1} - \Sigma \log \text{des concentrations du groupe 2}$$

L'ERMI leur permet ensuite d'évaluer si un logement est à risque pour un enfant de développer de l'asthme ou non. Certaines publications de l'équipe sont résumées dans le Tableau 3.

3. ERMI

3.1. Description des études utilisant l'ERMI

Les premiers travaux publiés de cette équipe concernant l'ERMI datent de 2004. Dans cette première étude à Cleveland dans l'Ohio aux Etats-Unis (Vesper et al., 2004), les maisons humides (n=6) étaient des maisons d'enfants avec hémorragie pulmonaire idiopathique (nommées "PHH"), et les maisons de référence (n=26) étaient des maisons sans moisissures visibles (nommées "RH"). 82 cibles de moisissures (espèces ou groupes de moisissures) ont été analysées par qPCR. Les auteurs s'étaient alors attelés à différencier les logements humides des non humides par l'analyse d'échantillons de poussières au moyen de la qPCR (Tableau 3). Les résultats obtenus ont montré que la somme des espèces retrouvées n'était pas statistiquement différente entre les logements humides et ceux de référence.

De ce constat a découlé la construction de deux groupes (groupe 1 = moisissures retrouvées dans les logements humides, groupe 2 = les autres) à la base du calcul de l'ERMI. Pour chacune des espèces de moisissures quantifiées, une moyenne a été calculée pour chaque type de logement (PHH et RH) ainsi que le rapport des deux (PHH/RH). Si PHH/RH était supérieur à 1, la moisissure en question était dite du groupe 1. Si PHH/RH était inférieur à 1, la moisissure était dite du groupe 2. Une fois les espèces rarement retrouvées enlevées, 26 ont pu être classées dans le groupe 1 et 10 dans le groupe 2 (Tableau 2).

D'après les auteurs, le groupe 1 est notamment dominé par les *Aspergillus* spp. qui seraient liés à des problèmes d'humidité. En prenant la différence des moyennes des logarithmes des concentrations

CONTEXTE / PROBLÉMATIQUE

des espèces des 2 groupes, les logements PHH et RH ont été statistiquement différenciés par une régression logistique (modèle de régression binomiale).

La même année, d'autres travaux de l'équipe, basés sur le même principe (Meklin et al., 2004), portent sur l'étude de 18 maisons humides/moisies ("MH") et 19 maisons de références ("RH") toujours dans l'Ohio, mais à Cincinnati (étude nommée 2004b dans les Tableau 2 et Tableau 3). De la même façon que pour l'étude précédente, 6 moisissures ont pu être classées dans le groupe 1 (signe d'humidité) et 19 dans le groupe 2 (communément retrouvées). Une régression logistique a ensuite été réalisée et les auteurs ont conclu que si la somme des logarithmes des concentrations des espèces du groupe 1 était supérieure à 19,4, le logement avait 95% de chances d'être humide ou moisi.

L'étude suivante (Vesper et al., 2006) a été réalisée dans l'Ohio, dans des maisons d'enfants asthmatiques ayant des problèmes d'humidité et des maisons témoins, sans problème d'humidité et sans enfant asthmatique. Les groupes 1 et 2 n'étaient pas tout à fait composés des mêmes cibles qPCR que dans les études précédentes (Tableau 2). C'est dans cette publication qu'apparaît pour la première fois le calcul de l'ERMI (nommé alors RMI). La publication rapporte que certaines cibles seraient associées significativement avec des phénomènes d'asthme (Tableau 3). L'équipe conclue enfin que si la valeur d'ERMI est supérieure à 1, il y a 80% de chance que l'enfant soit asthmatique. Les publications de 2007 utilisent une différenciation des cibles qPCR en groupe 1 et 2 qui est à nouveau différente de celle utilisée en 2006. Une étude dans le Nord de la Californie (Vesper et al., 2007a) permet de distinguer *Chaetomium globosum*, *A. fumigatus* et le groupe *Eurotium* comme étant plus abondants dans les logements d'enfants asthmatiques.

La classification en groupe 1 et groupe 2 change encore un peu lors d'une autre étude (le groupe *Eurotium* est ciblé à la place d'*Eurotium chevalieri*) (Vesper et al., 2007c). Les investigateurs classent les 271 maisons échantillonnées dans l'Ohio et le Kentucky en maisons "moisies" (MH) et maisons non "moisies" (NMH). En reclassant les logements en "très moisies" et "faiblement moisies" (par un modèle logistique et un calcul d'odds ratio), les auteurs concluent que les moisissures du groupe 1 sont en plus grande concentration dans les maisons où les enfants sont malades. La classification groupe 1 / groupe 2 utilisée dans cette publication est encore celle qui est actuellement utilisée par cette équipe. Elle compte 36 cibles qPCR au total dont 26 du groupe 1 et 10 du groupe 2.

CONTEXTE / PROBLÉMATIQUE

Globalement, un score ERMI est toujours plus élevé dans les domiciles d'enfants souffrant de pathologies respiratoires. Mais les espèces les plus impliquées dans les pathologies respiratoires observées sont différentes (Tableau 3) dans les diverses publications.

Tableau 2 : Classification des différentes cibles qPCR en moisissures du groupe 1 et moisissures du groupe 2 pour le calcul de l'ERMI

CIBLES qPCR					
Années					
2004a	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
2004b			1	2	1
				1	
2006		1	1		1
		1	1	1	
2007a	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
2007b	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1

Tableau 3 : Bilan des différentes études menées par l'équipe de Vesper

ANNÉES	LIEU	NOMBRES ET TYPES DE LOGEMENTS	PATHOLOGIES	CONCLUSIONS / ESPECES IMPLIQUÉES	RÉFÉRENCES
2004a	Cleveland Ohio	6 avec enfants hémorragie pulmonaire 26 de référence	hémorragie pulmonaire	L'ERMI est plus élevé chez les enfants avec hémorragie.	(Vesper et al., 2004)
2004b	Cincinnati Ohio	18 humides mois 19 de référence	Pas de pathologie	L'ERMI est plus élevé dans les logements humides.	(Meklin et al., 2004)
2006	Cleveland Ohio	60 avec asthmatiques + dégâts des eaux 22 de référence	Asthme	<i>S. brevicaulis</i> et <i>T. viride</i> sont reliés à l'asthme.	(Vesper et al., 2006)
2007a	Chapell Hill Californie Nord	19 avec asthmatiques 176 de référence	Asthme	<i>C. globosum</i> , <i>A. fumigatus</i> , et le groupe <i>Eurotium</i> sont reliés à l'asthme.	(Vesper et al., 2007a)
2007b	Cincinnati Ohio Nord Kentucky	154 avec moisissures visibles 115 sans moisissures visibles	Rhinite sifflements respiratoires	Le groupe 1 est globalement relié aux pathologies respiratoires observées.	(Vesper et al., 2007c)
2008	Michigan	28 avec enfants asthmatiques 83 avec enfants non asthmatiques	Asthme	<i>A. niger</i> et <i>A. unguis</i> sont reliés à l'asthme.	(Vesper et al., 2008b)
2011	Cincinnati Ohio	176	Asthme	Un ERMI élevé est lié à de la rhinite et une respiration sifflante chez l'enfant à 3 ans et à de l'asthme à 7 ans.	(Reponen et al., 2011)
2012	Cincinnati Ohio Nord Kentucky	289	Asthme	Un ERMI élevé et lié à l'asthme avec notamment quand <i>A. ochraceus</i> , <i>A. unguis</i> , <i>P. variable</i> sont présents	(Reponen et al., 2012)
2013	- Boston - Kansas - San Diego	- 76 avec asthmatiques, 34 de référence - 60 avec asthmatiques, 22 de référence - 93 avec asthmatiques, 92 de référence	Asthme	- <i>A. niger</i> , <i>A. pullulans</i> , <i>T. viride</i> sont liés à l'asthme - <i>A. niger</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>C. cladosporoides</i> , <i>P. chrysogenum</i> sont liés à l'asthme - 8 du groupe 1 sont liés à l'asthme : <i>A. niger</i> , <i>A. pullulans</i> , <i>T. viride</i> , <i>C. sphaerospermum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. variable</i> , <i>Scopulariopsis chartarum</i> , <i>W. sebi</i> et 7 / 10 du groupe 2	(Vesper et al., 2013)

3.2. Limites de l'ERMI

L'ERMI est une approche novatrice dans la mesure où son principe permet d'avoir une vision de la contamination fongique d'un logement puisque l'outil mesuré intègre la quantification de 36 espèces ou groupe d'espèces différentes.

En revanche, la mise en place de cet index peut soulever notre questionnement : il a tout d'abord été basé sur la discrimination de logements humides d'enfants avec hémorragies pulmonaires, puis utilisé dans des logements moisis (sans pathologie associée) pour maintenant permettre la détection de logements d'enfants à risque de développer de l'asthme.

De plus, lors de la mise en place de l'index, les logements d'enfants malades étaient toujours des logements humides. Or, certains logements ne présentant pas de signes d'humidité présentent toutefois de fortes contaminations de moisissures observées en culture (Roussel et al., 2008). Le calcul de leur index permet-il donc de relier les pathologies observées à la contamination fongique ? Ou ne serait-il pas biaisé par un contexte environnemental humide qui favoriserait le développement de l'asthme ou qui pourrait modifier l'effet des microorganismes et/ou de composés chimiques par exemple ? Les auteurs auraient peut-être dû vérifier si cet index permettait de discriminer les logements d'enfants asthmatiques dans le cas de logements non humides.

Les caractéristiques des logements ne sont pas prises en compte dans les premières publications. Elles n'apparaissent qu'en 2013 (Reponen et al., 2013), où des valeurs hautes d'ERMI ont été reliées à l'origine des habitants (africains), à leurs revenus (faibles), à la saison (hiver) et à l'âge du bâtiment (< à l'année 1955). A l'inverse, des valeurs plus faibles d'ERMI ont été retrouvées dans des logements ayant l'air conditionné.

Certains auteurs émettent des réserves sur l'utilisation de cet index et la classification des espèces en groupe 1 et 2. Par exemple, une équipe a trouvé *A. pullulans* et *Eurotium* groupe 1 en concentrations similaires dans tous les échantillons et se demande donc s'il est approprié de les mettre tous les deux dans le groupe 1, groupe rassemblant les moisissures "normalement" trouvées dans les logements humides (Pitkäranta et al., 2011). Une étude réalisée au Danemark (Andersen et al., 2011) avance *P. chrysogenum*, *A. versicolor*, et *C. globosum* comme étant les trois espèces les plus fréquemment retrouvées après dégâts des eaux et s'étonne donc que *P. chrysogenum* soit classé dans le groupe 2 de l'ERMI.

Aussi, l'ERMI ne permet pas de distinguer des logements ayant de faibles différences de contamination. Dans une de leurs publications de 2007, les auteurs n'ont pas trouvé de différence

statistiquement significative entre les concentrations fongiques de logements classés comme moisissus et non moisissus. La différence de concentration devenait conséquente uniquement pour les logements "très moisissus" (Vesper et al., 2007c).

De plus, la technique de prélèvements utilisée est-elle réellement une technique standardisée ? Dans les travaux de 2008, lorsque les parents étaient en mesure de fournir un sac d'aspirateur, c'est cette poussière qui était analysée. Il a aussi été rapporté que l'utilisation de la poussière récoltée sur le sol comme indicateur de l'exposition et l'inhalation des allergènes, peut être biaisée notamment par l'apport de poussières par les chaussures et que les prélèvements par EDC seraient donc plus adaptés (Frankel et al., 2012). Les EDC semblent d'ailleurs adaptés à la mesure des allergènes, des endotoxines, des micro-organismes et des acariens (Frankel et al., 2012; Noss et al., 2008).

Enfin, l'ERMI ne cible qu'un seul type de micro-organismes : les champignons microscopiques filamenteux. Une étude récente, analysant la composition fongique de l'environnement intérieur par séquençage haut débit (pyroséquençage, technologie 454, Roche) n'a pas montré de différence dans la composition fongique entre les logements d'enfants asthmatiques et d'enfants témoins (Dannemiller et al., 2014). Seule, une réduction de la diversité des *Cryptococcus* (levures) a été associée avec une augmentation du risque d'asthme.

Enfin, les agents étiologiques les plus impliqués, à savoir les acariens, ne sont pas ciblés. Des fortes valeurs d'ERMI ont d'ailleurs été liées à la présence d'allergènes d'acariens (Reponen et al., 2013).

4. Autre approche : Indice de diversité

Une autre équipe (finlandaise) intègre plusieurs marqueurs d'exposition environnementale microbienne dans leurs analyses. Ainsi, plusieurs types d'analyse d'exposition aux micro-organismes pour étudier l'apparition de l'asthme ont été utilisés (Karvonen et al., 2014) : les auteurs ont mesuré les endotoxines, les β -D-glucans, l'ergosterol, mais aussi des micro-organismes par le biais de la qPCR. Ils ont mesuré 6 moisissures ou groupes de moisissures (*A. fumigatus*, *Cladosporium* spp, groupe *Penicillium* spp. + *Aspergillus* spp. + *Paecilomyces variotii*, *S. chartarum*, *Trichoderma viride*, *Wallemia sebi*) et 2 bactéries (*Mycobacterium* spp., *Streptomyces* spp.). Ils ont ensuite calculé un indice de diversité en sommant la présence des 8 cibles.

D'après les auteurs l'utilisation de plusieurs biomarqueurs d'exposition permettrait de mieux prédire les pathologies respiratoires. Dans cette étude, les phénomènes de respiration sifflante diminuent significativement avec l'augmentation de l'indice de diversité. La même tendance, bien que non

significative, peut être observée pour l'asthme. *Streptomyces* spp. et le groupe *Penicillium* spp. + *Aspergillus* spp. + *P. variotii* pris individuellement semblent cependant être reliés positivement à l'asthme.

5. Bilan

Ainsi, d'un point de vue général, bien que la recherche avance dans ce domaine, les espèces impliquées, leurs rôles, les seuils déclencheurs des symptômes ou ayant un effet bénéfique sont encore à définir. De plus, seulement quelques rares études s'intéressent aux effets synergiques des microorganismes. Des travaux publiés en 2004 (Huttunen et al., 2004), rapportent l'effet synergique de *S. chartarum* qui pourrait augmenter l'effet inflammatoire de *Streptomyces californicus*, bactérie gram positif.

Concernant le risque infectieux, la surveillance environnementale très stricte à l'hôpital est inexistante aux domiciles des patients où jusqu'à présent, aucune mesure n'y avait été réalisée. Pour le risque allergique, l'ERMI et des indices de diversité ont été proposés comme indicateurs d'exposition, mais restent imparfaits. Il serait en effet souhaitable de pouvoir mesurer les différentes classes de microorganismes impliquées dans les pathologies respiratoires (moisissures, bactéries, acariens) et leurs interactions avec des méthodes spécifiques.

De nouveaux indicateurs d'exposition (risque infectieux et allergique), simples, utilisables à l'échelle de grande cohorte, doivent donc être développés pour pouvoir évaluer l'exposition microbiologique dans l'environnement intérieur.

OBJECTIFS DE LA THESE

Le risque infectieux chez les patients immunodéprimés dépend principalement des facteurs d'hôtes (immunodépression, traitements) mais aussi de l'exposition du patient aux espèces fongiques. Le risque allergique, et notamment l'asthme, dépend de facteurs génétiques, d'exposition au stress, d'appartenance ethnique ou de type d'alimentation (Lynch et al., 2014) mais aussi de facteurs d'exposition environnementale. Dans les deux cas, des mesures de prévention sont envisageables pour améliorer les conditions environnementales d'exposition des personnes.

L'objectif de la thèse était donc d'étudier la composition microbiologique d'environnements intérieurs afin d'évaluer les microorganismes, ou profils de microorganismes liés aux risques infectieux et allergiques. De nouveaux indicateurs d'exposition, dans le but de donner des conseils de prise en charge, ont été établis.

Pour cela, des mesures par culture et qPCR ont été réalisées aux domiciles de patients immunodéprimés (à risque d'IFI) et de patients atteints de mucoviscidose (à risque d'ABPA) dans le cadre de deux études locales (FIQCS et TIARÉ). D'autre part, dans le cadre de l'étude ELFE (Etude Longitudinale Française depuis l'Enfance), des mesures par qPCR sur des prélèvements provenant de logements de 3200 enfants ont été réalisés.

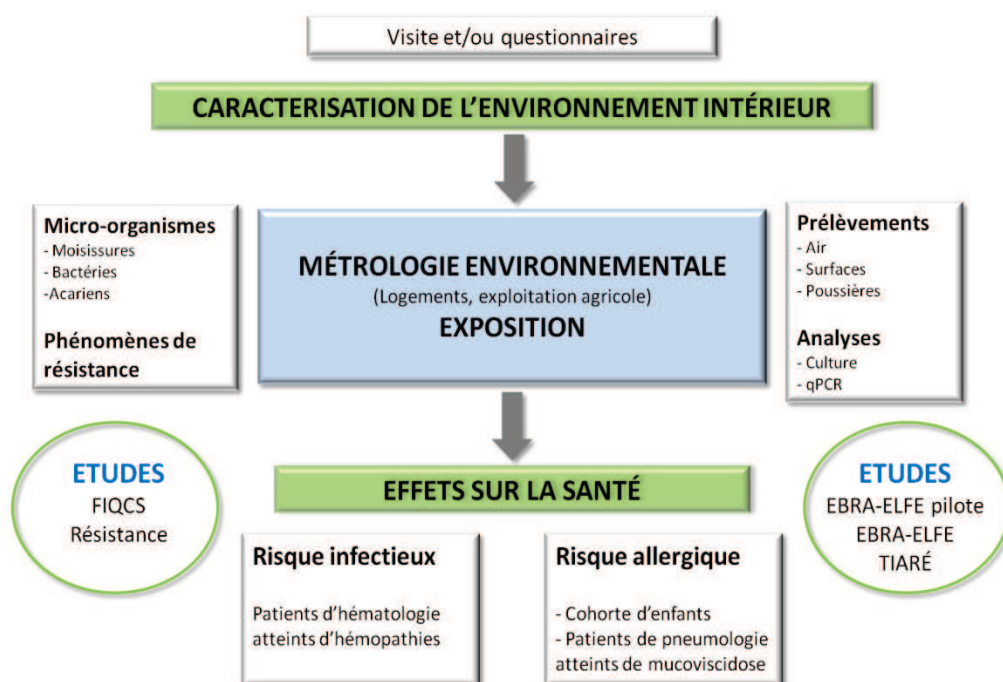


Figure 7 : Schéma des études intégrées dans le travail de la thèse

CHAPITRE 1

Environnement fongique de logements et risque infectieux chez les patients immunodéprimés : Étude FIQCS et recherche de résistance

A. Étude FIQCS : Contamination fongique au domicile de patients immunodéprimés

1. Contexte

En dehors des traitements antifongiques, la prévention des IFI chez les patients à risque repose sur la maîtrise de leur environnement. En effet, l'incidence des IFI dépend de plusieurs facteurs liés à l'hôte et/ou de l'environnement auquel il est exposé. La principale voie d'entrée des spores fongiques étant l'inhalation, il apparaît important d'essayer de maîtriser la qualité de l'air dans lequel se trouvent les patients. Lors de leur hospitalisation pour une greffe de CSH, de nombreuses précautions sont prises pour éviter aux patients en aplasie d'être en contact avec des moisissures. Durant la période d'aplasie, ainsi que dans la période de neutropénie qui lui succède, différentes mesures sont prises au sein des services d'hématologie des hôpitaux. Le risque de développer une AI chez un patient neutropénique a été estimé à +1% à chaque jour de neutropénie supplémentaire les 3 premières semaines et à +4% ensuite (Kousha et al., 2011). L'air des chambres des patients est traité (distribution par filtre HEPA (High Efficiency Particulate Air)), les locaux sont nettoyés (2 à 3 fois par jour), les aliments sont conditionnés de manière stérile et les visites sont limitées (avec passage obligatoire par un sas d'habillage et de nettoyage des mains).

De nombreuses études s'intéressent à la contamination dans les hôpitaux et l'incidence des mycoses invasives (Bouza et al., 2002; Bénet et al., 2007; Chamilos et al., 2006; Cornet et al., 2002; Fourneret-Vivier et al., 2006; Kousha et al., 2011; Partridge-Hinckley et al., 2009). Le Tableau 4 en présente quelques-unes.

Avant les années 2000, des seuils de risque ont été définis dans certaines études. Des augmentations d'incidence d'AI pourraient être observées lorsque la contamination du service d'hématologie en *Aspergillus* est supérieure à 0,9 UFC/m³ (Rhame, 1991). L'incidence diminuerait lorsque la contamination serait inférieure à 0,2 UFC/m³ (Arnou et al., 1991) et aucun cas ne surviendrait en-dessous de 0,009 UFC/m³ (Sherertz et al., 1987).

Les travaux extérieurs, surtout ceux de terrassement, sont souvent incriminés. Ils mettent une quantité importante de spores en suspension dans l'air environnant l'hôpital, même lorsque les travaux se situent à plusieurs kilomètres. Une augmentation du nombre de cas d'AI dans les services d'hématologie a été observée lors de travaux à proximité des hôpitaux (Morisson et al, 2004). Différents facteurs environnementaux pouvant influencer la contamination en *Aspergillus* ont

CHAPITRE 1

également été étudiés au sein des hôpitaux. Ainsi, il a été montré que l'épidémiologie des IFI dépendait des conditions météorologiques qui étaient différentes selon les régions étudiées. Par exemple, des pics d'incidence d'AI ont été observés juste après des saisons sèches et chaudes (Panackal et al., 2010) et la saison a déjà été incriminée dans l'incidence des AI (Warris et al., 2001).

En plus des nombreuses précautions prises dans les services d'hématologie, la conférence de consensus de 2000 (Consensus Conference, 2001) recommande de réaliser des contrôles trimestriels de la flore fongique dans les services d'hématologie et de greffe. A Besançon, le service des Soins Intensifs d'Hématologie (SIH) est composé de 15 lits et se trouve dans un secteur protégé (séparé des couloirs du même étage par deux sas). Il accueille annuellement 125 patients (correspondant à 275 séjours d'hospitalisation), et réalise 50 allogreffes par an.

Comme le recommande la conférence du consensus de 2000, des enquêtes trimestrielles y sont réalisées : des prélèvements de surfaces (par écouvillonnage de 25cm²) et des prélèvements d'air (par impacteur MAS 100TM Merck®) sont réalisés dans les couloirs et dans toutes les chambres du service. Depuis 2002, une surveillance hebdomadaire est également réalisée dans les couloirs du service (prélèvements d'air et de surfaces) et dans les couloirs généraux de l'hôpital (lieux de passage des patients en amont des services). Les échantillons d'air prélevés par impaction (250 litres) sont analysés par observation macroscopique et microscopique après 7 jours de culture à 30°C, sur milieu DG18. Ces mesures de surveillance complémentaires sont considérées comme des "sentinelles" pouvant prévenir un risque aspergillaire : en effet, elles permettent de renforcer les mesures de précautions lorsqu'une contamination est détectée dans les couloirs. Un seuil d'alerte de la contamination de l'air des couloirs généraux du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Jean Minjoz de Besançon pour les espèces potentiellement responsables d'IFI (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Lichtheimia (Absidia)* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp.) a été fixé à 40 ufc/m³. Dans le service SIH, l'objectif "zéro *A. fumigatus*" est visé dans les chambres. Ainsi, 12 pics d'*A. fumigatus* (>40UFC/m³) ont été détectés dans le couloirs généraux du CHU ces 10 dernières années et ont pu être reliés à des travaux intérieurs et extérieurs et à la remise en marche du chauffage (Reboux et al., 2014). *A. fumigatus* a été détecté jusqu'à six fois par an dans les couloirs des SIH mais aucun lien n'a pu être statistiquement établi avec l'incidence des AI.

CHAPITRE 1

Tableau 4 : Liste non exhaustive de quelques études portant sur les l'incidence de l'AI et/ou sur les prélèvements de contrôles réalisés à l'hôpital

	OBSERVATIONS	CONCLUSIONS	REFERENCES
Études	Relation entre niveaux de contamination fongique en hématologie et incidence des AI	Un pic > 2 UFC/m ³ entraîne une augmentation significative de l'incidence.	(Alberti et al., 2001)
	Relation entre travaux à l'hôpital et niveau de contamination fongique	Des niveaux plus hauts à l'extérieur de l'hôpital mais aussi dans les zones à air non protégé ont été observés.	(Bouza et al., 2002)
	Relation entre déplacement de l'unité d'hématologie et incidence des AI	La ventilation dans les chambres diminue l'incidence des AI.	(Bénet et al., 2007)
	Utilisation de qPCR pour détecter les <i>Aspergillus</i>	La qPCR permet de détecter d'autres sources de contamination aspergillaire.	(Morrison et al., 2004)
	Influence de différents facteurs sur flore fongique détectée à l'hôpital	Les facteurs intérieurs (mesures de prévention) mais aussi extérieurs (Saisons, hautes températures extérieures, vents, pluies) augmentent les quantités de spores détectées.	(Brenier-Pinchart et al., 2009)
	Relation entre filtration de l'eau en hématologie et contamination microbiologique	La filtration de l'eau diminue la présence d' <i>A. fumigatus</i> et des autres filamenteux	(Warris et al., 2010)
	Influence climatique et géographique sur l'incidence des AI	Des pics d'incidence d'AI sont observés juste après des saisons sèches et chaudes.	(Panackal et al., 2010)
	Relation entre niveaux de contamination fongique et incidence d'AI chez des patients greffés du cœur	Le diagnostic d'AI coïncide avec des pics de contamination qui augmentent le risque lorsqu'ils sont > 17,4 UFC/m ³ .	(Peláez et al., 2012)
	Étude rétrospective de la contamination des couloirs de l'hôpital et du service d'hématologie	Le seuil de 40 CFU/m ³ dans les couloirs est utilisé depuis 10 ans pour conseiller des mesures de nettoyage et diminuer le risque	(Reboux et al., 2014)
Revue ou guides	Étude bilan des situations à risque dans le service d'hématologie	Le risque est diminué si la contamination est < 5 UFC/m ³ dans les couloirs protégés et <0,1 UFC/m ³ dans les chambres avec filtres HEPA.	(Warris et al., 2001)
	Étude bilan sur les facteurs de risque notamment environnementaux pour les AI	Différents facteurs sont évoqués : - Des sources intérieures et extérieures à l'hôpital - Les conditions météorologiques - Les habitudes personnelles - Les travaux de construction - Les plantes, fleurs, tapis, douches	(Pagano et al., 2011)
	Seuils de spores acceptables pour diminuer le risque d'AI	Des seuils de 25UFC/m ³ dans les zones non protégées et 0,5 UFC/m ³ dans les zones protégées sont conseillés pour diminuer le risque d'AI.	(Ruiz-Camps et al., 2011)

CHAPITRE 1

Il a été montré que l'incidence des AI avait une distribution bimodale chez les patients allogreffés (Figure 8): Les AI surviennent tout de suite après la greffe de CSH lorsque le patient est hospitalisé et que de nombreuses précautions sont prises mais aussi 100 jours (78 à 112) après la greffe, lorsque le patient est rentré à domicile (Kousha et al., 2011). A ce stade, le patient est dans un environnement qui peut être plus ou moins contaminé.

Depuis peu, certains auteurs évoquent le besoin de prendre en considération les habitudes personnelles et le style de vie des patients qui peuvent arriver à l'hôpital déjà colonisés avant leur traitement (Pagano et al., 2011). Une protection absolue des patients est bien sur impossible, mais donner des conseils pourrait aider à éviter des expositions excessives (Kontoyiannis, 2013). Le besoin de guides à domicile fait l'unanimité, avec des conseils qui devraient être adaptés aux types de patients avec des précautions prises au moins pendant six mois après une allogreffe de moelle (Akan et al., 2013; Tomblyn et al., 2009). Ainsi, les patients rentrés à domicile devraient éviter tout contact avec la poussière (ménage et aspirateur), la terre (plantes) et ne pas fréquenter des endroits humides susceptibles d'être moisiss (Tomblyn et al., 2009). Ils ne doivent pas non plus consommer de fruits secs, d'épices et d'herbes non cuisinés et éviter les noix et le fromage (Akan et al., 2013).

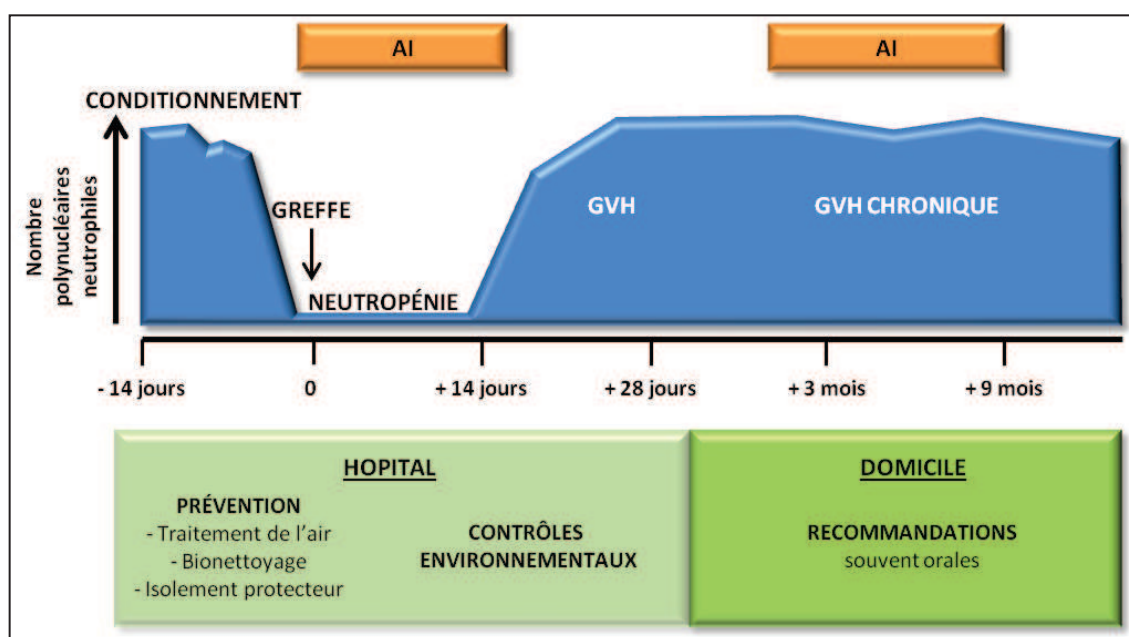


Figure 8 : Schéma de l'incidence bimodale de l'Aspergillose invasive chez un patient allogreffé en fonction de l'état immunitaire du patient et des mesures environnementales prises.
(D'après la présentation de Ruhnke (TIMM Copenhague octobre 2013)
lui-même inspiré de HJ. Dornbush et C. Cordonnier).

CHAPITRE 1

Kontoyiannis va même plus loin et dénonce le fait que la sécurité des patients et leur bien être devraient être assurés lorsque ceux-ci sont rentrés à domicile, en développant des mesures environnementales et en prodiguant du nettoyage en cas de contamination, comme cela serait fait dans un hôpital (Kontoyiannis, 2013). En revanche, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée réellement à la contamination fongique aux domiciles des patients d'hématologie.

2. Présentation de l'étude

Nous avons donc étudié la contamination fongique de domiciles de patients immunodéprimés chroniques qui rentrent à domicile après des périodes d'aplasie.

Des logements de patients du service d'hématologie du CHU Jean Minjoz ont ainsi été analysés en collaboration avec le Service d'Hématologie (Pr. Eric DECONINCK) dans le cadre de l'Etude FIQCS "hématologie" (Fond d'Intervention pour la Qualité et la Coordination des Soins). Il s'agissait de patients traités pour une hémopathie qui rentrent à domicile entre deux cures de chimiothérapie ou après une greffe de CSH. Ces patients, aux défenses immunitaires amoindries (taux PNN bas), risquent de développer des infections fongiques invasives.

Les patients du service d'hématologie ayant subi une période d'aplasie entre janvier et mai des années 2010, 2011 et 2012 ont donc été sollicités pour participer à l'étude lors de leur sortie du service. Tout patient hospitalisé plusieurs fois durant les 3 ans de l'étude n'a été contacté qu'une seule fois. Les internes du service d'hématologie présentaient l'étude aux patients, qui étaient ensuite contactés par téléphone. Pour des raisons techniques de déplacement, les critères d'inclusion étaient limités aux patients (adultes ou enfants) habitant à moins de 300 km de Besançon.

Pour chaque logement, un questionnaire, établi d'après celui utilisé lors d'une étude menée de 2004 à 2006 (Roussel et al., 2008) a été rempli avec le patient avant la réalisation de l'enquête microbiologique. Il comportait différentes parties :

- Des questions générales sur le logement (année de construction, type, surface, type de ventilation...).
- Des informations détaillées sur les différentes pièces prélevées (revêtement sol et murs, temps d'aération, surface, nombre de fenêtres...).
- Des renseignements concernant les habitudes et/ou activités du patient au sein de son logement.

CHAPITRE 1

Des prélèvements d'air, de surface et de poussières ont été réalisés dans 4 pièces du logement et analysés par culture et qPCR. Les moisissures responsables d'IFI ont particulièrement été recherchées dans les domiciles des patients: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *L. corymbifera*, *Mucor spp*, *Rhizomucor spp*, *Rhizopus spp*, *F. solani*, *S. apiospermum*.

L'historique de chaque patient, de la date du diagnostic de l'hémopathie jusqu'au décès du patient ou à la fin de l'étude en mai 2012, a été retracé. Les données médicales telles que les différentes périodes d'hospitalisation, les épisodes de neutropénie, les traitements antifongiques, immunosuppresseurs et corticoïdes ont été relevés. Tous les critères permettant le diagnostic d'IFI tels que les résultats des scanners et les antigènes aspergillaires ont été collectés.

La surveillance environnementale du service des SIH au CHRU de Besançon, qui existe depuis 1977, est devenue trimestrielle depuis 1984. Comme en 2002 la surveillance est devenue hebdomadaire dans les couloirs du service des SIH, toutes les données de surveillance de ce service, durant l'hospitalisation des patients de l'étude FIQCS, ont été relevées.

Toutes les données cliniques des dossiers médicaux impliquées dans le diagnostic des IFI ont été recherchées. Ainsi, les résultats d'imagerie (scanner), les examens biologiques (biopsie, antigènes aspergillaires, cultures positives à champignons filamenteux et numérations formule sanguine) des patients ont été collectés. Chaque période d'hospitalisation a été relevée et confrontée aux contaminations du service d'hématologie afin de détecter une exposition potentielle du patient aux moisissures opportunistes lors de son hospitalisation. Ceci a permis de mettre en évidence, pour chaque patient, tous les facteurs de risque potentiels au développement d'une IFI (allogreffe, traitements immunosuppresseurs, corticoïdes, durée de neutropénie, contaminations environnementales à l'hôpital et au domicile...). Un exemple de suivi de patients est illustré dans le CHAPITRE 1, partie "Résultats complémentaires de l'étude FIQCS".

3. Principaux résultats

Cinquante-trois patients (sur 79 contactés) ont accepté d'avoir une mesure de la contamination fongique à leur domicile. La plupart d'entre eux étaient atteints de leucémie aigüe myéloïde. Treize patients ont développé une AI et un patient une IFI (l'espèce fongique en cause n'a pas pu être identifiée).

Les logements analysés correspondaient à des logements "standards" (21,8°C et 38,5% d'humidité relative en moyenne) ne présentant pas de problèmes d'humidité. Dans 66% des cas, les logements avaient moins de 170 UFC/m³ d'air et ont donc été considérés comme faiblement contaminés

CHAPITRE 1

(Reboux et al., 2009). Comme l'infection la plus représentée dans cette cohorte de patients était l'AI, l'analyse des logements s'est concentrée sur les deux espèces les plus impliquées dans cette infection à savoir *A. fumigatus* et *A. flavus*. Ces deux espèces ont été retrouvées dans 58% des logements.

Les 4 patients ayant les plus hauts pourcentages (>20%) d'*A. fumigatus* et *A. flavus* par rapport aux moisissures totales dans leur logement étaient 4 patients qui ont développé une AI/IFI et 3 d'entre eux n'ont visiblement été exposés qu'à domicile (aucune contamination détectée à l'hôpital lors de leur séjour). Ce pourcentage d'*A. fumigatus/flavus* par rapport aux moisissures totales est le seul facteur prédictif d'AI/IFI qui est ressorti de l'analyse statistique faite lors de cette étude.

4. Article présentant les résultats de l'étude FIQCS

Titre:

Evaluation of invasive aspergillosis risk of immunocompromised patients alternatively hospitalized in hematology intensive care unit and at home

Auteurs:

Steffi ROCCHI, Gabriel REBOUX, Fabrice LAROSA, Emeline SCHERER, Etienne DAGUINDAU, Ana BERCEANU, Eric DECONINCK, Laurence MILLON, Anne-Pauline BELLANGER

Journal:

Indoor Air, accepté pour publication le 06 mars 2014

CHAPITRE 1

5. Résultats complémentaires de l'étude FIQCS

5.1. Suivi individuel des patients

La Figure 9 montre un exemple de la chronologie des données qui ont pu être relevées et synthétisées pour un patient.

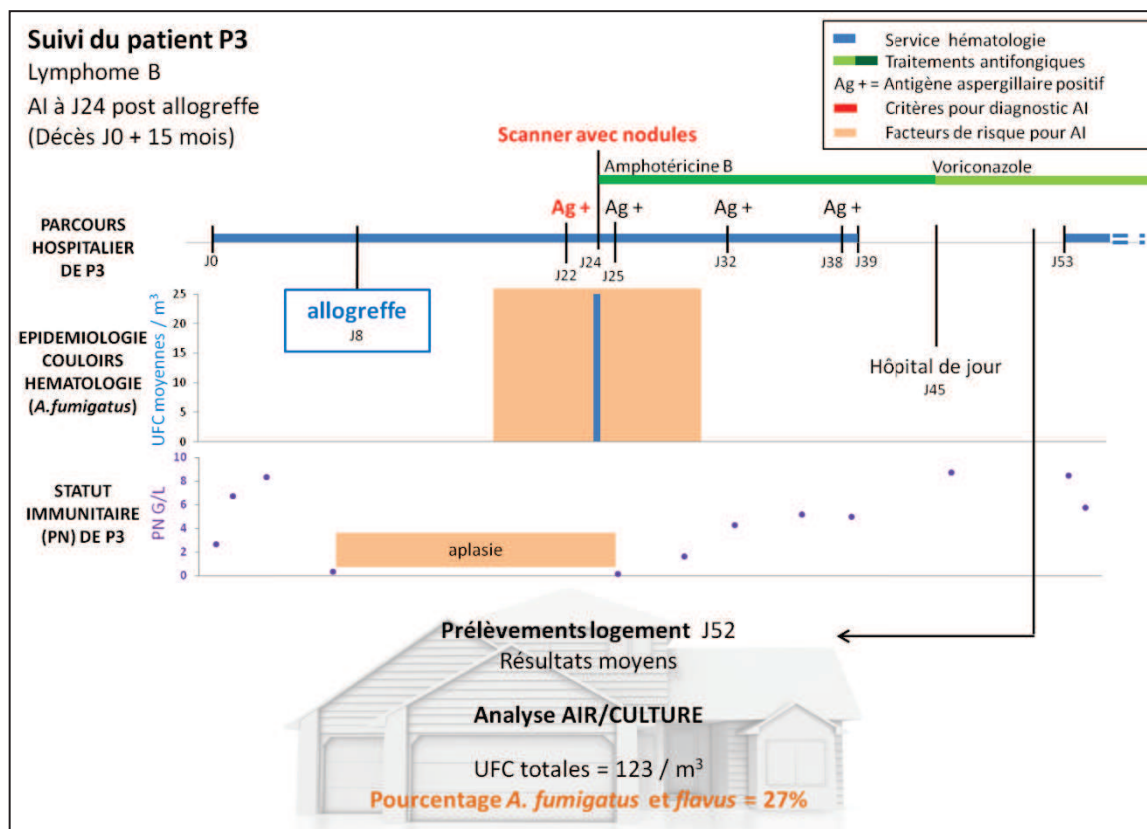


Figure 9 : Exemple du suivi réalisé pour un patient ayant fait une aspergillose invasive

Le patient P3 a été hospitalisé en SIH (de J0 à J39) pour une allogreffe de CSH (à J8). Le diagnostic d'AI a été posé à J24 (antigène aspergillaire positif à J22 et scanner évocateur d'AI à J24). En plus d'avoir eu une période d'aplasie prolongée, ce patient était hospitalisé dans le service à une période où un pic de contamination a été détecté dans le couloir, et vivait avant son hospitalisation dans un logement présentant un fort pourcentage d'*A. fumigatus/flavus* par rapport aux moisissures totales. Différents scénarios peuvent ainsi être envisagés : Le patient a pu être exposé à l'hôpital (passage dans le couloir contaminé ou suspicion de contamination dans la chambre) ou il a été exposé à domicile et s'est colonisé chez lui avant son hospitalisation.

5.2. Analyse des EDC déposés dans les logements par qPCR

Les résultats qPCR obtenus à partir des EDC sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : qPCR réalisées à partir des EDC (quantités d'ADN exprimées en fg/μL)

Patients	<i>A. fumigatus</i>	<i>Mucor/Rhizopus</i> spp.	<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Rhizomucor</i> spp.
P1	67	145	26	1
P2	0	3	0	0
P3	2029	63	80	2
P4	34	93	1	0
P5	0	5	4	0
P6	0	93	1	0
P7	117	3	15	1
P8	112	329	39	1
P10	18	107	5	1
P11	5	147	0	0
P12	15	4	0	0
P13	826	193	6	0
P14	1	21	5	0
P15	247	22	6	1
P16	253	93	48	1
P17	13	14	1	0
P18	0	10	3	0
P19	117	63	10	1
P20	43	120	26	4
P21	248	39	8	2
P22	12	16	2	0
P23	94	37	2	0
P24	21	2	7	0
P25	0	6	9	0
P26	859	38	17	0

Patients	<i>A. fumigatus</i>	<i>Mucor/Rhizopus</i> spp.	<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Rhizomucor</i> spp.
P29	48	1	0	0
P30	43	38	4	1
P31	155	56	14	1
P32	0	29	5	0
P33	347	30	5	0
P34	849	91	810	11
P35	0	14	1	0
P36	12	8	7	2
P37	39	92	23	0
P38	165	96	6	2
P39	9	209	0	1
P40	350	4	2	1
P41	176	31	2	0
P42	693	16	538	3
P43	320	23	2	1
P45	123	43	30	1
P46	27	97	10	0
P47	3	235	23	0
P48	2	2	1	0
P49	183	359	2	1
P50	396	21	0	0
P51	91	93	20	1
P52	280	1	2	0
P53	451	176	1	1

(3 boitiers / 53 (P27, P28, P44) ne sont pas revenus au laboratoire)

CHAPITRE 1

La cible *A. fumigatus* a été détectée dans 81 % des cas avec des quantités d'ADN allant jusqu'à 2029 fg/μL (Tableau 5). Ce capteur à poussières était celui du patient dont l'historique est présenté Figure 9.

La cible *A. flavus* n'a pas été analysée par qPCR du à son manque de spécificité (croisement avec *A. fumigatus*). La qPCR *F. solani* n'a pas été détectée et n'est donc pas présentée dans le Tableau 5.

Trois qPCR mucorales ont également été utilisées. La qPCR ciblant *Mucor/Rhizopus* spp. Etait positive dans 100 % des cas, avec des quantités d'ADN allant de 1 à 359 fg/μL. La qPCR ciblant *L. corymbifera* était positive dans 88% des cas, avec un maximum de 810 fg/μL d'ADN quantifié et *Rhizomucor* spp. n'a été détectée que dans 46% des cas, avec des faibles quantités d'ADN détectées (maximum à 11 fg/μL).

B. Environnement, fongicides et phénomène de résistance

1. Contexte

Un risque particulier supplémentaire existe pour les patients immunodéprimés : ils peuvent être infectés par des souches d'*A. fumigatus* résistantes aux antifongiques azolés. Ce phénomène nouveau est probablement lié à la pression de sélection par les fongicides utilisés en agriculture.

1.1. États des lieux

Les fongicides agricoles représentent 40% des pesticides répandus sur les cultures, et 25% de ces fongicides sont des triazolés (Denning and Bowyer, 2013). Les triazolés font partie des fongicides appelés inhibiteurs de la déméthylation (IDM) et semblent pour l'instant incontournables dans la protection des cultures (site BASF).

Les traitements azolés médicaux sont couramment utilisés en première intention pour le traitement des AI. Ils sont apparus en 1990. L'itraconazole a été le premier azolé administré, par voie orale, pour l'AI. Le voriconazole, introduit en 1996, est souvent recommandé comme premier traitement contre l'AI (Verweij et al., 2009b). Le posaconazole est quant à lui arrivé en dernier sur le marché.

Les azolés (agricoles et médicaux) inhibent la voie de synthèse de l'ergostérol, stérol majeur de la membrane cellulaire fongique, et diminuent ainsi l'intégrité de la membrane cellulaire (Verweij et al., 2009b). Depuis quelques années, des phénomènes de résistance aux antifongiques ont pu être observés (Figure 10, Figure 11, Figure 12) et compromettent ainsi la survie des patients.

La mutation TR34/L98H (sur le gène *cyp51A*), a été mise en évidence dans le cas de multi résistance aux azolés. Cette mutation a été isolée pour la première fois aux Pays-Bas en 1998 (Verweij et al., 2011). Elle consiste en une répétition en tandem de 34pb dans la région du promoteur, qui augmente l'expression du gène, couplée avec une substitution de la leucine en histidine en position 98 qui diminue l'affinité des azolés. Le taux de mortalité de patients atteints d'AI à *A. fumigatus* TR34/L98H est estimé à 80% (Denning and Bowyer, 2013).

Différents arguments permettent d'avancer une potentielle origine environnementale de la mutation TR34/L98H.

CHAPITRE 1

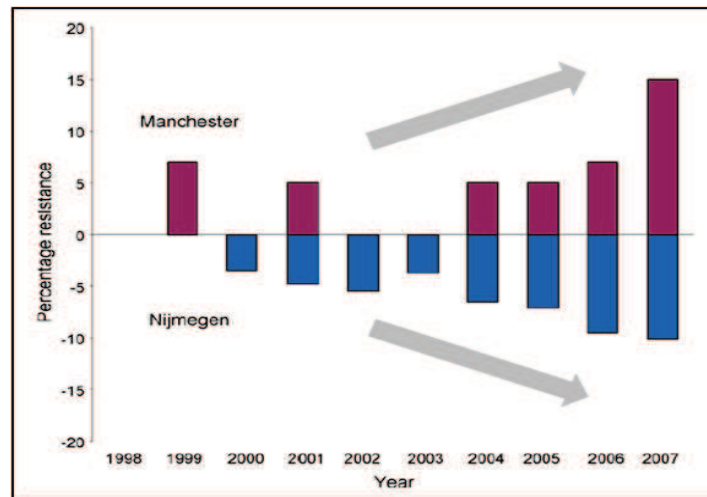


Figure 10 : Pourcentage de patients avec souche d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés aux Pays Bas (Nijmegen) et en Angleterre (Manchester). (Verweij et al., 2009a)

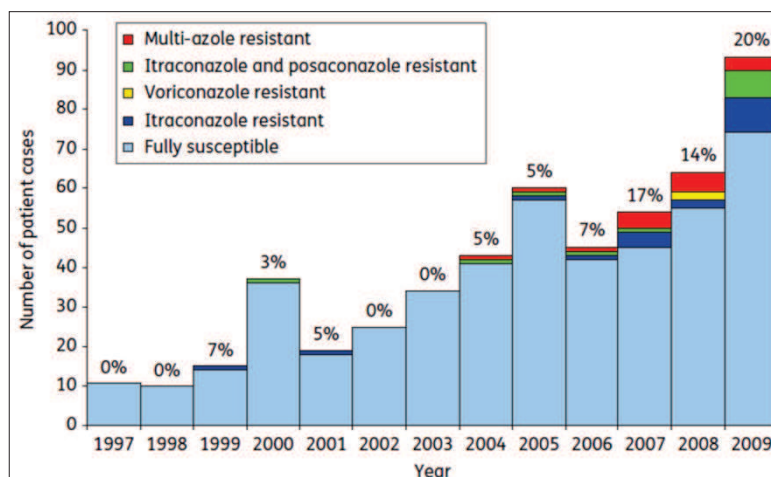


Figure 11 : Fréquence des *A. fumigatus* résistants aux azolés par patients de 1997 à 2009 au centre mycologique de Manchester. (Bueid et al., 2010).

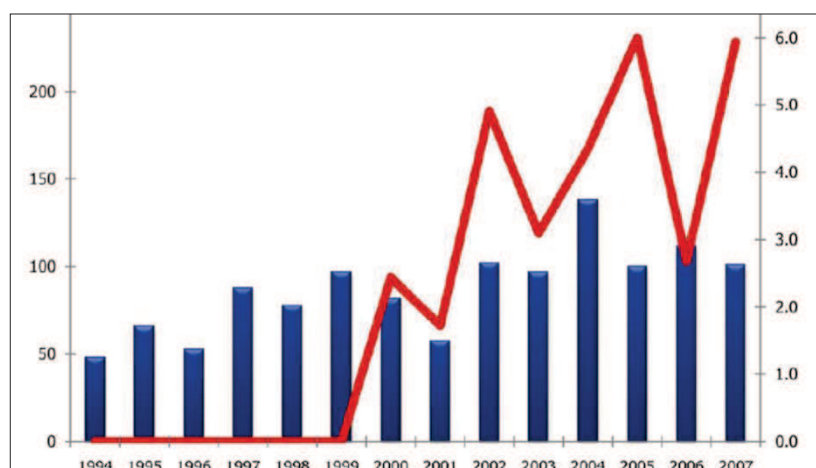


Figure 12 : Répartition du nombre de patients avec culture positive à *A. fumigatus* (en bleu, axe gauche) et pourcentage de patients avec souches résistantes à l'itraconazole (en rouge, axe droit) entre 1994 et 2007 à l'hôpital de Nijmegen aux Pays-Bas. (Snelders et al., 2008).

CHAPITRE 1

1.2. Critères épidémiologiques

Depuis le premier isolat clinique décrit en 1998, la prévalence de l'isolement de souche d'*A. fumigatus* avec la mutation TR34/L98H ne fait qu'augmenter. L'étude de Snelders et al., déjà mentionnée, a montré que 94% des isolats cliniques résistants à l'itraconazole possédaient le même mécanisme de résistance : TR34/L98H (Snelders et al., 2008).

La dominance d'un seul type de mécanisme de résistance peut difficilement être expliquée par le développement individuel d'une résistance à un traitement. La transmission de patient à patient est à ce jour inconnue et visiblement peu probable (Verweij et al., 2011). Des souches possédant la même mutation ont d'ailleurs également été retrouvées dans des prélèvements environnementaux (sols, compost, graines) (Snelders et al., 2009) et ont donc appuyé cette origine environnementale. Cette mutation a été retrouvée dans des prélèvements cliniques et environnementaux dans de nombreux pays (Tableau 6).

Tableau 6 : Isolement de souches TR34/L98H dans différents pays

PAYS	ISOLEMENT DE LA MUTATION TR34/L98H	REFERENCES ETUDES
Pays-Bas (Nijmegen)	94% des isolats cliniques résistants itraconazole	(Snelders et al., 2008)
Pays-Bas (autres villes)	69% des isolats cliniques résistants itraconazole	
Norvège	1 isolat provenant d'un prélèvement d'eau	
Angleterre	Isolats cliniques chez 2 patients	(Howard et al., 2009)
Pays-Bas	20,4% des sols, compost, graines	(Snelders et al., 2009)
Danemark	8% des sols	(Mortensen et al., 2010)
Danemark	Isolats cliniques de 2 patients atteints de mucoviscidose	(Mortensen et al., 2011)
Angleterre	Patients atteints d'ABPA et Aspergilloses chroniques	(Denning et al., 2011)
Chine	27,6% des isolats résistants. 1,6% des souches au total	(Lockhart et al., 2011)
France	2 patients atteints de mucoviscidose	(Burgel et al., 2012)
Allemagne	1 patient avec LAM*	(Hamprrecht et al., 2012)
Inde	7% des prélèvements de sols	(Chowdhary et al., 2012b)
Inde	2 patients COPD** et ABPA	(Chowdhary et al., 2012a)
France	6% des patients atteints de mucoviscidose	(Morio et al., 2012)
Espagne	1 patient avec LMC***	(Mellado et al., 2013)
Iran	3,3% des <i>A.fumigatus</i> provenant de l'environnement	(Badali et al., 2013)
Italie	15 % des prélèvements de sols	(Prigitano et al., 2014)
Koweït	7% des prélèvements de sols et d'air extérieur	(Ahmad et al., 2014)

En vert, apparaissent les prélèvements issus de l'environnement.

* Leucémie Aiguë Myéloïde ; ** Chronic Obstructive Pulmonary Disease ; *** Leucémie Myéloïde Chronique

CHAPITRE 1

Les azolés (triadimefon et imidazil) sont utilisés depuis 1973 et les triazolés ont été introduits en 1980. Un peu moins de la moitié des cultures céréalières et viticoles sont traités par des azolés en Europe (Mortensen et al., 2010) contre moins de 5% aux Etats-Unis. Ils sont utilisés pour la protection des céréales, fruits, plantes herbacées et dans l'industrie du bois également (Tableau 7).

Aux Pays-Bas, l'utilisation de fongicides azolés a plus que doublée depuis les années 1990 (Figure 13). Les IDM ont été autorisés entre 1990 et 1996. L'étude de Snelders et al. en 2012 (Snelders et al., 2012), a montré que la mutation TR34/L98H datait de cette période. L'utilisation des fongicides au Danemark a largement augmenté depuis 1999 et des souches résistantes ont été retrouvées pour la première fois en 2009 (Mortensen et al., 2010).

Cette "nouvelle" agriculture, permettrait visiblement de sélectionner des souches qui deviendraient résistantes dans l'environnement et qui auraient donc un avantage vis-à-vis des souches sensibles.

Tableau 7 : Efficacité des triazolés sur les maladies du blé et de l'orge. (Source : Site BASF)

MOLECULES	g/ha	ACTIVITÉ SUR LES MALADIES DU BLÉ								ACTIVITÉ SUR LES MALADIES DE L'ORGE					
		Piétin verse	Oïdium	Septorioses		Rouilles		Helminthosporiose	Fusarioses/ épis		Rhynchosporiose	Oïdium	Rouille raine	Helminthosporiose	Grillures / Ramulariose
				<i>S. tritici</i>	<i>S. nodorum</i>	jaune	brune		<i>F. graminearum</i>	<i>M. nivale/majus</i>					
prochloraze	450	•		•	••					••	••			•	
ciproconazole	80 à 100		•		•	•••	•••	•	•		•	••	•••		
difénoconazole	125				••	••	•	•	•						
époxyconazole	125	•		••	•••	•••	•••	•	•	•	•••	••	•••	•	•
flusilazole	200	•			•••	••	••	•	•		•••	••	••	•	
flutriafol	125				•	••	•				•	••	•		
metconazole	90			••	•••	•••	•••	•	••		••	••	•••	•	
propiconazole	125				••	••	•	••	•		••	••	••	•	
tébuconazole	250		•		•••	•••	•••	••	••		••	••	•••		
tétraconazole	125	•	•		••	••	••	•							
triadiménol	125				•	•••	•	•							
prothioconazole	200	••		•••	•••	••	••	•••	••	•••	•••	••	••	•••	•••

Source : Arvalis-Institut du végétal, Lutte contre les maladies des céréales, 2012.

Activité : •••• excellente ••• bonne •• moyenne • faible vide : insuffisante ou absence d'information.

CHAPITRE 1

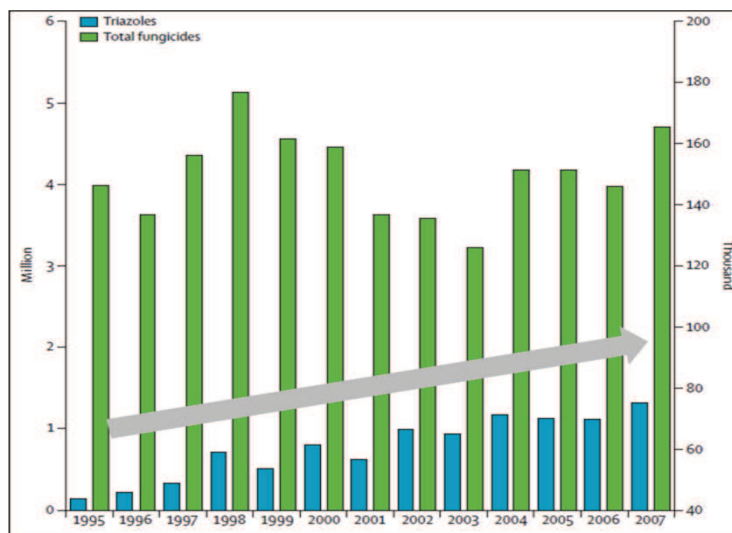


Figure 13 : Utilisation des fongicides (totaux, axe gauche et azolés, axe droit) aux Pays Bas de 1995 à 2007. (Verweij et al., 2009b)

D'autres type de mutations retrouvées chez des patients n'ayant pas reçu de traitements azolés et ayant probablement également une origine environnementale ont été décrites. En janvier 2010, une souche uniquement résistante au voriconazole est isolée aux Pays Bas par l'équipe de Van der Linden (van der Linden et al., 2013). La première souche TR46/Y121F/T289A est ainsi décrite pour la première fois. Elle combine une répétition en tandem avec deux mutations ponctuelles. En 2013, cette équipe a publié les résultats provenant d'une étude environnementale : sur 140 souches résistantes, 10% contiennent ce nouveau type de mutation. Un autre cas avec cette mutation a été décrit en Belgique (Vermeulen et al., 2012). En 2011, une souche multi-résistante aux azolés ayant la mutation G432S a été isolée chez un patient n'ayant jamais reçu de traitements azolés (Alanio et al., 2011). Cette mutation est connue chez *Mycosphaerella graminicola*, pathogène du blé, et est principalement contrôlé par les azolés utilisés en agriculture (Verweij et al., 2011). Ce type de souche résistante capable de coloniser un patient pourrait également provenir de l'environnement.

1.3. Arguments mécanistiques et moléculaires

L'insertion en tandem (TR34) est le plus souvent introduite lors de la reproduction sexuée, qui se passe surtout dans l'environnement, et non une fois le patient colonisé (Stensvold et al., 2012). Des expériences d'induction *in vitro* de la mutation TR34/L98H ont montré que des phénotypes résistants étaient obtenus au bout de trois repiquages (Snelders et al., 2012). Il existe de plus une similarité moléculaire des antifongiques azolés médicaux avec certains azolés agricoles, comme le propiconazole, le bromuconazole, l'époxiconazole, le difenconazole et le tébuconazole, qui ont montré des résistances croisées (Snelders et al., 2012).

Ces phénomènes de résistance, observés dans plusieurs pays, laissent présager d'un phénomène qui se disperse. La prévalence de la résistance aux azolés est d'ailleurs certainement sous-estimée puisque les tests de susceptibilité *in vitro* des *A. fumigatus* aux azolés ne sont pas toujours réalisés dans de nombreux laboratoires. Des études montrent aussi que des prélèvements présentant des cultures négatives ont toutefois des mutations sur le gène CYP51A, détectées par PCR (Denning et al., 2011).

2. Présentation d'un cas d'AI résistante, avec isolement de souches cliniques et environnementale portant la mutation TR34/L98H

Une souche d'*A. fumigatus* a été retrouvée dans des crachats d'un patient agriculteur présentant une AI probable et suivi dans le service d'hématologie de Besançon. Les tests de sensibilité aux antifongiques ont montré que cette souche était multirésistante aux antifongiques azolés (itraconazole et voriconazole). Le séquençage du gène *cyp51A* (réalisé au Centre National de Référence Mycologie et Antifongiques, Paris) a permis l'identification de la mutation TR34/L98H. L'hypothèse d'une origine environnementale de cette mutation, due à l'utilisation de fongicides agricoles (Snelders et al., 2012), nous a amenés à étudier l'environnement de ce patient agriculteur qui utilisait des fongicides azolés sur son exploitation.

3. Principaux résultats

Des prélèvements environnementaux, identiques à ceux menés dans le cadre de l'étude FIQCS ont été réalisés au domicile du patient et des échantillons provenant de l'environnement extérieur ont aussi été collectés. Les prélèvements de l'environnement extérieur consistaient en 6 points de prélèvements d'air dans le village, 18 prélèvements de feuilles, mousses et sols, 4 prélèvements de fourrage (paille et foin) et 3 prélèvements de poussières contenues dans les filtres du tracteur. 145 souches d'*A. fumigatus* (20 provenant de l'environnement intérieur et 125 de l'extérieur) ont ainsi été mises en évidence par culture. Une souche portant la mutation TR34/L98H a été identifiée dans un des prélèvements de sol. Le champ en question était un ancien champ traité avec des fongicides azolés (prothioconazole et epoxiconazole). La prévalence de cette mutation (1/145) était donc plus faible que celle qui peut être observée aux Pays-Bas alors que la Franche-Comté utilise des quantités d'azolés agricoles semblables (Tableau 8). Mais une telle étude montre que même dans un environnement où l'incidence des souches avec la mutation TR34/L98H est faible, un patient immunodéprimé peut être infecté et développer une AI résistante.

CHAPITRE 1

Tableau 8 : Comparaison de l'utilisation des 5 fongicides agricoles (propiconazole, bromuconazole, epoxiconazole, difenconazole, tebuconazole) et la prévalence de la mutation TR34/L98H en Franche-Comté et aux Pays-Bas

	FRANCHE-COMTÉ	PAYS-BAS
Utilisation des 5 azolés agricoles	0,62kg/km ²	0,86kg/km ²
Prévalence mutation TR34/L98H	0,7%	0,8% à 9,5% *

* (European Centre for Disease prevention and Control, 2013)

4. Article présentant le cas d'AI résistante

Titre:

Azole-resistant TR34/L98H *Aspergillus fumigatus* in both fungicide-sprayed field and lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis

Auteurs:

Steffi ROCCHI, Etienne DAGUINDAU, Frédéric GRENOUILLET, Eric DECONINCK, Anne-Pauline BELLANGER, Déa GARCIA-HERMOSO, Stéphane BRETAGNE, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON

Journal:

Journal of Clinical Microbiology, accepté pour publication le 11 février 2014

CHAPITRE 2

Environnement microbiologique de logements et risque allergique chez l'enfant : Étude EBRA ELFE

1. Contexte

Différentes pathologies respiratoires ont été reliées à l'exposition de bioaérosols. L'allergie est une réponse inflammatoire à l'exposition d'un agent de l'environnement (non retrouvée lors des phénomènes de sensibilisation) qui entraîne une réponse immunitaire exagérée (notamment IgE) par rapport à l'agent en cause (Denning et al., 2014). Les phénomènes allergiques sont de plus en plus rencontrés dans les pays industrialisés. L'allergie se manifeste par différents symptômes cliniques tels que la rhinite, la conjonctivite ou encore l'asthme. Parmi les facteurs impliqués dans l'asthme, des expositions actuelles plus longues dans l'environnement intérieur ont été mises en cause. Mais l'augmentation de l'occurrence de cette maladie serait également partiellement attribuable aux meilleurs diagnostics médicaux et à des parents plus avertis sur les symptômes développés chez leurs enfants (Kasznia-Kocot et al., 2010).

Le coût de l'asthme a été estimé à 3 milliards d'euros par an en Europe en 2005 (European Environment Agency) et à 15 milliards de dollars par an aux Etats-Unis (Sullivan and Weiss, 2001) incluant les milliers de décès et les jours d'absentéisme scolaire et professionnel. En France, l'asthme toucherait 6,7 % de personnes selon l'institut de recherche et de documentation en économie de la santé (chiffres de 2006) avec une prévalence cumulée approchant 10% (Delmas et al., 2009). Aux Etats-Unis, 9% des enfants en âge d'aller à l'école seraient touchés par l'asthme (Eggleson, 2007). La plupart des asthmatiques (85%) en Amérique, Asie du Sud Est, Europe et Australie seraient allergiques aux acariens (Platts-Mills et al., 1997). 22 millions de personnes seraient asthmatiques aux Etats-Unis (Gern et al., 2009) et 4,6 millions de ces cas d'asthme ont été attribués à l'exposition aux moisissures (Mudarri and Fisk, 2007).

Les études de cohortes de naissance sont essentielles pour comprendre l'apparition des maladies respiratoires au cours de la vie des enfants. Plus de 100 cohortes ont été initiées dans le monde ces 30 dernières années (Bousquet et al., 2013). Certaines sont présentées dans les Tableau 9 et Tableau 10. Pour celles qui proposent une approche environnementale, des investigateurs se déplacent dans les domiciles pour constater un dégât des eaux et la présence de moisissures mais ne réalisent souvent pas de véritables mesures, spécifiques aux espèces retrouvées. L'étude GABRIELA recherche les moisissures et les bactéries par culture, d'autres comme PASTURE mesurent les endotoxines et une étude de 2014 (déjà mentionnée en 4.4) utilise des qPCR fongiques et bactériennes (Karvonen et al., 2014).

Tableau 9 : Bilan cohortes d'enfants et maladies respiratoires

NOMS ÉTUDES COHORTES	PAYS	ANNÉES	TYPE DE PRÉLÈVEMENTS ET MESURES D'EXPOSITION A DOMICILE	NOMBRES ENFANTS	CONCLUSIONS PRINCIPALES	RÉFÉRENCES
ALEX	Autriche Allemagne Suisse	1999	Poussières (mais non détaillé)	1406	Les enfants des fermes sont moins sensibles.	(Riedler et al., 2001)
/	Allemagne	1997-1999	Poussières : Endotoxines	1884	L'exposition aux endotoxines (premiers 6 mois) protège de l'asthme	(Gehring et al., 2001)
PARSIFAL	Autriche Allemagne Suisse Pays-Bas Suède	/	Poussières : Endotoxines, B glucanes, EPS (<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>), allergènes (dont acariens)	14893	L'exposition aux endotoxines et aux composés fongiques entraînent une protection vis-à-vis des maladies respiratoires allergiques.	(Schram-Bijkerk et al., 2005)
/	Etats-Unis (New York)	/	Endotoxines Allergènes	301	La présence d'endotoxines est inversement associée à l'eczéma chez les enfants.	(Perzanowski et al., 2006)
LUKAS (PARSIFAL)	Finlande	2002-2005	/	396	L'humidité et la présence de moisissures entraînent des sifflements respiratoires.	(Karvonen et al., 2009)
/	Finlande	1984-1989	/	2568	L'humidité et la présence de moisissures augmentent le risque d'asthme.	(Jaakkola et al., 2010)
/	Danemark	1998-2001	/	361	/	(Bisgaard et al., 2010)
PARSIFAL GABRIELA	Allemagne Suisse	2000-2002 2006-2007	Poussières (16s bactéries) Poussières EDC (bactéries et moisissures)	933	Une grande diversité de microorganismes diminue le risque d'asthme (<i>Penicillium</i> , <i>Eurotium</i> entre autres)	(Ege et al., 2011)
Projet ACCESS	Etats-Unis (Boston)	2002-2007	/	997	/	(Tse et al., 2012)
Danish nationale birth	Danemark	1996-2003	/	53637	/	(Hansen et al., 2012)
IOH birth cohort	Angleterre	1989-1990	/	1456	/	(Soto-Ramirez et al., 2013)
INMA PIAMA LISA	Espagne Pays-Bas Allemagne	1996-1999	Poussières : Endotoxines, polysaccharides, $\beta(1,3)$ -D-glucan dans (à 2 mois)	781	La présence d'endotoxines et des chiens entraînent une faible fraction exhalée de NO (pas d'effet des $\beta(1,3)$ -D-glucan, des chats et de l'humidité).	(Casas et al., 2013b)

Cohorte enfants de 15 ans	France	2003-2005	COV Index fongique à partir de COV (CSTB)	897 (431 logements)	Plus l'index fongique est élevé est plus les adultes ont de l'asthme et des bronchites chroniques.	(Hulin et al., 2013)
BAMSE GASPII INMA MAAS PIAMA GINIplus LISAplus	Suède Italie Espagne Angleterre Pays-Bas Allemagne	1994-1996 2003-2004 2005-2008 1995-1997 1996-1997 1995-1998 1997-1999	8 éléments chimiques	15980	Le zinc a un effet sur l'incidence de la pneumonie.	(Fuertes et al., 2014)
ENVIRH study	Portugal	2010	COV, gaz, bactéries, moisissures (MASS), acariens (poussières + ELISA)	1221	/	(Araujo-Martins et al., 2014)
URECA	Etats-Unis (4 villes)	2005-2007	Allergènes Analyse 16s bactéries	104	L'exposition à certains allergènes et bactéries réduisent les sifflements récurrents et l'atopie.	(Lynch et al., 2014)
Une partie de PASTURE + autres	Finlande	2002-2005	Endotoxines, B glucanes, EPS, qPCR (6 moisissures, 2 bactéries)	410	Un haut score de diversité diminue risques de sifflements.	(Karvonen et al., 2014)
REGROUPEMENT DE COHORTES (détails tableau suivant)						
GA ² LEN : 18 cohortes	Europe	1985-2004	12 cohortes : poussières 11 cohortes : allergènes (dont acariens) 5 cohortes : endotoxines	/	/	(Keil et al., 2006)
ENRIECO 37 cohortes	Europe (19 pays)	1985-2012	27 cohortes : allergènes et microorganismes	/	/	(Vrijheid et al., 2012)
MeDALL CHICOS ENRIECO GA ² LEN	Europe	2010-2014 2010-2012 2009-2010 2004-2010	7 cohortes : environnement / / 12 cohortes : environnement	/	/	(Bousquet et al., 2013)

CHAPITRE 2

Tableau 10 : Regroupements de cohortes européennes

	ETUDES ENVIRONNEMENT	PAYS	ANNÉE	NOMBRE D'ENFANTS
GA ² LEN (Bousquet et al., 2013)	Isle of Wight	Angleterre	1989	1456
	ECA	Norvège	1992	3754
	AMICS-Ashford	Angleterre	1993	642
	BAMSE	Suède	1994	4089
	MASS	Angleterre	1995	957
	GINI-B	Allemagne	1996	3739
	AMICS-Barcelona	Espagne	1996	487
	AMICS-Menorca	Espagne	1997	485
	KOALA	Pays-Bas	2001	2834
	PARIS	France	2003	3855
	PLANK	Lituanie	2004	205
	ALADDIN	Suède	2004	330
MeDALL (Bousquet et al., 2013)	ECA	Norvège	1992	3754
	BAMSE	Suède	1994	4089
	GINI-plus	Allemagne	1996	5591
	AMICS-Menorca	Espagne	1997	485
	PARIS	France	2003	3855
	INMA	Espagne	/	2021
	RHEA	Grèce	/	1497
INRIECO (Vrijheid et al., 2012)	ALSPAC	Angleterre	1991-1992	14062
	BAMSE	Suède	1994-1996	4089
	CO.N.ER	Italie	2004-2005	654
	DARC	Danemark	1998-1999	562
	DNBC	Danemark	1996-2002	96986
	Duisburg	Allemagne	2000-2003	234
	ELFE	France	2011-2012	20000
	FLEHS I	Belgique	2002-2004	1196
	GASPII	Italie	2003-2004	708
	Generation R	Pays-Bas	2001-2006	9778
	Generation XXI	Portugal	2005-2006	8647
	GINIplus	Allemagne	1995-1998	5591
	HUMIS	Norvège	2002-2011	2500
	INMA old	Espagne	1997-2002	1252
	INMA new	Espagne	2003-2008	2505
	KOALA	Pays-Bas	2000-2003	2834
	Krakow	Pologne	2000-2003	505
	Leicester	Angleterre	1985-1997	10350
	LISApplus	Allemagne	1997-1998	3097
	LUKAS	Finlande	2002-2005	442
	MAS	Allemagne	1990	1314
	MoBA	Norvège	1999-2008	107000
	NINFEA	Italie	2005-	7500
	PARIS	France	2003-2006	3840
	PIAMA	Pays-Bas	1996-1997	3963
	REPRO_PL	Pologne	2007-2011	1800
	RHEA	Grèce	2007-2008	1500

Ainsi, nos travaux sur la thématique allergique essayent de palier à la plupart des problèmes soulevés précédemment, en utilisant des méthodes de prélèvement (EDC) et d'analyse (qPCR) standardisées tout en intégrant plusieurs microorganismes à l'échelle du territoire français.

2. Présentation des études ELFE pilote et EBRA ELFE

L'étude ELFE (Etude Longitudinale Française depuis l'Enfance) est la première étude française consacrée au suivi des enfants, de leur naissance à leur majorité. Cette étude inclue un peu plus de 18 000 enfants français nés en 2011 : 1 bébé sur 50 nés en 2011 est donc un bébé ELFE. Différents aspects tels que la santé, l'environnement et les sciences sociales seront étudiés. Un des axes de recherche est l'analyse biologique de l'environnement de l'enfant dès sa naissance et l'apparition de phénomènes allergiques et/ou asthmatiques. Il est sous la responsabilité du Pr. Chantal RAHERISON, responsable du groupe maladie respiratoire du projet ELFE et du Dr. Gabriel REBOUX, responsable scientifique du projet EBRA (Environnement Biologique et Risque Allergique) ELFE.

Une étude pilote a été réalisée dans 53 logements de Picardie, Bourgogne et Franche-Comté afin de mettre au point les techniques utilisées pour la sous-cohorte EBRA ELFE.

Cette sous-cohorte se concentre sur certaines familles volontaires qui ont reçu à la maternité un EDC à installer dans la chambre de l'enfant. Le recrutement des enfants s'est fait à leur naissance en 2011, dans 340 maternités françaises, selon quatre périodes de l'année, sélectionnées pour représenter chaque saison : du 1er avril au 4 avril, du 27 juin au 4 juillet, du 27 septembre au 4 octobre et enfin du 28 novembre au 5 décembre.

Différents questionnaires, gérés par l'Institut National d'Etudes Démographiques (INED), ont été et seront remplis avec les parents (à la naissance, aux 2 mois de l'enfant, entre 3 et 10 mois, à 2 ans ...). Pour l'interprétation des données, dans le cadre de cette thèse, seul certains questionnaires ont été étudiés : le premier entretien avec la maman à la maternité, le dossier médical à la naissance et l'enquête téléphonique aux 2 mois des enfants. D'autres informations paraissant sur les EDC (date de dépôt, date de fermeture, pièce...) ont également été relevées.

Dix microorganismes ont été recherchés dans les logements des enfants :

- 6 moisissures : *A. alternata*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *P. chrysogenum*, *S. chartarum*,
- 3 groupes de bactéries : Enterobacteriaceae, Mycobacteria, *Streptomyces* spp.
- 1 acarien : *D. pteronyssinus*.

3. Principaux résultats

3.1. Étude pilote EBRA ELFE

L'étude pilote a permis de choisir un type de lingette qui retenait le moins possible les spores et donc l'ADN lors du processus de rinçage. Les tests qPCR ont montré des bonnes spécificités (pas de croisement) et répétabilités (signal qPCR constant) des cibles choisies.

Les prélèvements réalisés dans les logements ont montré des répartitions différentes des 10 cibles (Figure 14).

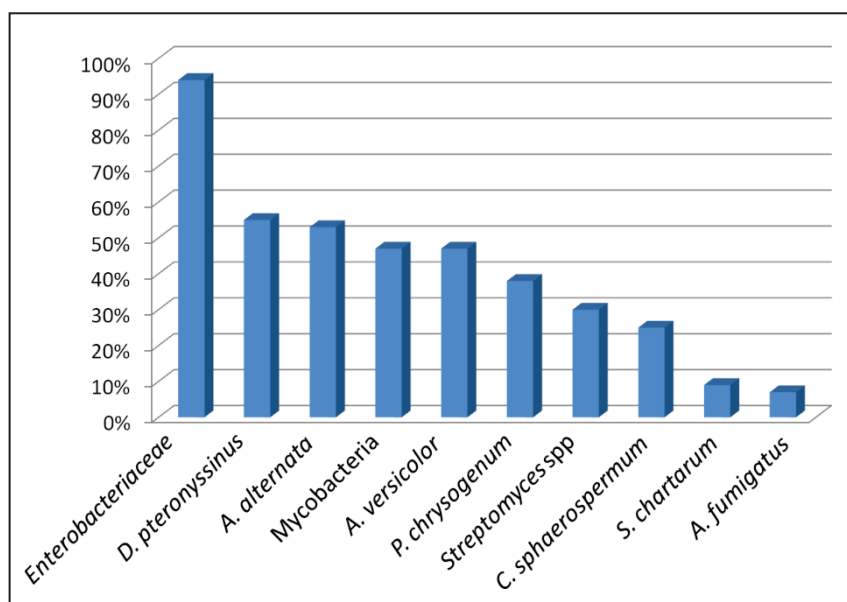


Figure 14 : Pourcentage de détection des 10 cibles dans les logements de l'étude pilote

Une analyse en composante principale a montré que la présence et la quantification des 10 cibles n'étaient pas liées.

3.2. Étude EBRA ELFE

Une première approche statistique réalisée sur les 3193 logements d'enfants français nés en 2011, a permis, à l'aide d'une analyse en composante principale partielle prenant en compte l'effet du mois de dépôt du capteur, de catégoriser ceux-ci vis-à-vis des 10 cibles de qPCR. Quatre entités semblent discriminer les logements entre eux : *A. alternata*, les autres moisissures, les bactéries et l'acarien.

CHAPITRE 2

Six profils de logements différents, basés sur la construction de clusters caractérisés par leur contamination en microorganismes, ont ainsi pu être définis :

- Un profil très peu contaminé
- Un profil peu contaminé par les bactéries
- Un profil dominé par *A. alternata* et les 3 bactéries
- Un profil dominé par les 3 bactéries et l'acarien
- Un profil mixte avec *A. alternata*, les 3 bactéries et l'acarien
- Un profil fortement dominé par *A. alternata* et les 3 bactéries

Ces six profils sont représentés dans toutes les régions de France. En revanche, lorsque l'on caractérise une région par le profil dominant qui y est retrouvé, des répartitions géographiques différentes peuvent être observées. Le profil très peu contaminé domine dans le Nord de la France, le profil bactéries/acarien domine en Bretagne, le profil mixte domine dans le Sud-Ouest et le profil *A.alternata*/bactéries domine dans le reste de la France. La répartition des profils de logements coïncide avec celle des sifflements respiratoires observée lors d'une étude publiée en 2012 (Delmas et al., 2012).

Une analyse de redondance a également été réalisée sur les caractéristiques intrinsèques des logements et a pu mettre en évidence un lien entre ratio d'occupation (nombre d'habitant / unité de surface) au sein des logements et contaminations en *D. pteronyssinus*, *Enterobacteriaceae* et *C. sphaerospermum* observées. De la même façon, le type d'habitat (appartement ou maison) et la présence ou l'absence d'animaux domestiques ont pu être reliés à la présence de certains microorganismes : *A. alternata*, *A. versicolor*, *Mycobacteria* et *Streptomyces* sont associés aux animaux domestiques et aux maisons alors que les appartements et l'absence d'animaux domestiques est reliée à la présence d'*A. fumigatus* uniquement.

CHAPITRE 2

4. Article présentant les résultats de l'étude pilote EBRA ELFE

Titre:

qPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dust from dwellings in large cohort studies

Auteurs:

Emeline SCHERER, Steffi ROCCHI, Gabriel REBOUX, Stéphanie VANDENTORREN, Sandrine ROUSSEL, Mallory VACHEYROU, Chantal RAHERISON, Laurence MILLON

Journal:

Science of the Total Environment, accepté pour publication le 15 juillet 2013

CHAPITRE 2

5. Article présentant les résultats descriptifs des logements de la cohorte EBRA ELFE

Titre:

Microbiological characterization of 3193 French dwellings of ELFE cohort children

Auteurs:

Steffi ROCCHI, Gabriel REBOUX, Victor FROSSARD, Emeline SCHERER, Benoit VALLOT, Audrey LABOISSIERE, Mallory VACHEYROU, François GILLET, Sandrine ROUSSEL, Chantale RAHERISON, Laurence MILLON

Journal:

Science of the Total Environment, soumis le 22 juillet 2014

Microbiological characterization of 3193 French dwellings of Elfe cohort children

S. Rocchi ^{a,b}, G. Reboux ^{a,b}, V. Frossard ^a, E. Scherer ^{a,b}, B. Valot ^a, A. Laboissière ^{a,b},
M. Vacheyrou ^a, F. Gillet ^a, S. Roussel ^{a,b}, C. Raherison ^{c,d}, L. Millon ^{a,b} and the Elfe team

^a Chrono-Environnement Research Team UMR/CNRS-6249-Franche-Comté University, Besançon, France

^b Department of Parasitology and Mycology, University Hospital, Besançon, France

^c Department of Pneumology, University Hospital, Bordeaux, France

^d Occupational Health Environment Research Team, EA 3672, ISPED, Bordeaux 2 University, France

Keywords

Elfe cohort, electrostatic dust fall collector (EDC), dwelling qPCR profiles, microorganisms geographical location, respiratory disorders

Abstract

Although exposure to indoor microorganisms in early life has already been associated with respiratory illness or allergy protection, only a few studies have performed standardized samplings and specific microbial analysis. Moreover, most do not target the different groups of microorganisms involved in respiratory diseases (fungi, bacteria, dust mites).

In our study, ten specific qPCR targets (6 fungal species, 1 family and 2 genera of bacteria, 1 house dust mite) were used to analyze the microorganism composition of electrostatic dust fall collector (EDC) from 3193 dwellings of the Elfe French cohort study.

Multivariate analyses allowed us to show that the microbial composition of dwellings, assessed with simultaneous analysis of 10 microorganisms, can be characterized by four entities: the 3 bacteria, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Alternaria alternata*, and the five other molds. Some dwellings' intrinsic

characteristics (occupational ratio, type of dwelling and presence of pets) clearly influence microorganism distribution, and six different profiles of dwellings, characterized by their composition in microorganisms, have been described across France.

The use of these clusters seems promising in the evaluation of allergic risk. Allergic respiratory diseases will develop in the near future in some children of the Elfe cohort and will indicate to what extent our approach can be predictive of respiratory disease.

Introduction

Several studies deal with microorganisms and their implication in allergic respiratory illness or symptoms such as wheezing, allergic rhinitis and asthma. Dust mite allergy is the most common, and some molds like *Aspergillus* spp. (Agarwal and Gupta, 2010), *Alternaria* spp. (Salo et al., 2006), *Penicillium* spp. (Bundy et al., 2009), *Cladosporium* spp. (Garrett et al., 1998) are also involved in respiratory disorders. However, in their

review, Bornehag *et al.* showed that only four publications out of the 547 studies on this subject (1998-2000) presented fungal concentration measures in dwellings (Bornehag *et al.*, 2004). Tischer and colleagues (Tischer *et al.*, 2011a) found 1398 scientific publications with at least one keyword related to respiratory disorders, but only 36 publications included measurements of exposure and health outcomes validated by medical advice.

Over the past 30 years, more than 100 cohorts of children have been created around the world (Bousquet *et al.*, 2013) to study asthma and allergy (Keil *et al.*, 2006).

Exposure to indoor fungi in early life has already been associated with respiratory illness. Children's exposure to fungi at 8 months of age has been linked to rhinitis and wheezing at 3 years and asthma at 7 (Reponen *et al.*, 2012; Reponen *et al.*, 2011). Conversely, in the ALEX (Riedler *et al.*, 2001), PARSIFAL (Schram-Bijkerk *et al.*, 2005), and PASTURE (Ege *et al.*, 2011; Karvonen *et al.*, 2014; Roussel *et al.*, 2011) studies, proponents of the hygienist theory (von Mutius, 2007), suggested that early-life exposure to microbial agents such as molds and bacteria may offer protection against atopic wheezing and asthma.

Overall, many child cohort studies have been based on questioning parents to assess microorganism effects on respiratory health. In the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) studies (phases I, II and III), parents answered questionnaires and the presence of dampness was linked to respiratory disorders. However, the use of metrology is now gaining in importance especially when studies such as those of Roussel *et al.* (Roussel *et al.*, 2008) showed that 18% of sampled rooms had no damp smell nor visible moulds on walls, though the

air was, in fact, contaminated (> 470 fungi colony forming unit /m³). Thus, some studies have included microbial measures such as biomarkers. The birth cohort Epidemiology of Home Allergens and Asthma Study (EHAAS) analyzed fungal and bacterial biomarkers such as β -d glucans, endotoxins, muramic acid and ergosterol in family room dust samples (Sordillo *et al.*, 2011). Finally, only a few studies have done specific microbial measurement with standardized tools like quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) (Karvonen *et al.*, 2014; Reponen *et al.*, 2012; Reponen *et al.*, 2011).

In our study, we used the Electrostatic Dust fall Collector (EDC) (Frankel *et al.*, 2012; Noss *et al.*, 2008) and qPCR, with the Standard Operational Procedure (SOP) previously described (Scherer 2014), to assess the microbiology composition of a large number of dwellings. We analyzed a sample of children's dwellings included in the Elfe ("Etude Longitudinale Française depuis l'Enfance") project (Vandentorren *et al.*, 2009). Elfe was the first multidisciplinary French cohort devoted to monitoring children's development in France from birth to adulthood. This Elfe subsampling, called EBRA ("Environnement Biologique et Risque Allergique") study, included 6390 children's dwellings. We targeted ten microorganisms by qPCR: 6 molds, 3 bacteria and 1 mite (Scherer *et al.*, 2014) using a multi-group approach to study microorganisms involved in respiratory diseases. The aim of our study was to describe the microbial composition of French dwellings included in the EBRA-Elfe study with a multivariate analysis to analyze the main factors involved: geographic distribution, meteorology, socioeconomic levels, parents' health and the intrinsic characteristics of dwellings. Finally, we sought to find a new proxy that could summarize the microbial composition of French housing.

ARTICLE SOUMIS A STOTEN

Materiel and methods

Recruitment of children and questionnaires

From April 2011, midwives of 344 maternity wards in France asked mothers if they were willing to participate in the Elfe study. Recruitments were made over several four-day periods the same year: from April 1 to April 4, from June 27 to July 4, September 27 to October 4 and finally November 28 to December 5. Some randomly selected families also received an EDC to install in their child's room for two months. Thus, 6390 EDC were distributed at the children's births. 3217 well-identified EDC were returned to the laboratory in time and 3193 of the 3217 families who sent EDC responded to the questionnaire. In fact, mothers were interviewed at the maternity ward for medical information about their pregnancy and the newborn baby, their exposure to pollutants and their eating habits. Two months after the birth, telephone interviews with mothers and fathers took place and included different types of questions. The lists of variables were:

- Demographic and socioeconomic variables including country of birth, educational level, profession, monthly income, number of family members.

- Dwelling characteristics such as type, surface area, number of rooms.

- Health variables of both children and parents: parents' asthma and eczema, mother's psychological difficulties, children's birth weight and height. Clinical and medical data related to pregnancy were also accessible and used as variables.

Families signed a consent form presenting the general aim of the study and all data were anonymous. For privacy concerns, the geographical location of the dwellings could only be indicated at the regional level.

Sample analysis

EDC were washed and rapid DNA extraction was performed from the washing liquid using

mechanical and thermal lysis (runs in MagNA Lyser Instrument (Roche Applied Science®, Mannheim, Germany), boiling water bath and ice) as previously described (Scherer et al., 2014).

Primers and hydrolyze probes were used in the qPCR analyses. Ten specific qPCR targets were used as previously described and distributed as follows:

- 6 fungal species: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium chrysogenum* and *Stachybotrys chartarum* described by Haugland et al. (Haugland et al., 2004) (and available at <http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>);
- 1 family and 2 genera of bacteria: Enterobacteriaceae (Sen and Asher, 2001), Mycobacteria (Torvinen et al., 2006) and *Streptomyces* spp. (Rintala and Nevalainen, 2006);
- 1 house dust mite: *Dermatophagoïdes pteronyssinus* using primers and probes developed in our laboratory (Roussel et al., 2013).

Statistical analysis

A partial principal component analysis (pPCA) was performed to explore the relationships between the different qPCR targets. PCA is a multivariate ordination analysis that simplifies a complex data set to a reduced number of dimensions or axes, called principal components (PC). The first axes are projected on one or two ordination plots in which samples (dwellings) and variables (qPCR targets) are represented by points and arrows, respectively (Legendre and Legendre, 2012). Specificity of pPCA compared to PCA consists in removing the effect of the temporal structure contained in the dataset by including sampling month as a conditional variable constraining the PCA. This was done to

account for a seasonal effect that has been seen in different studies in both indoor and outdoor environments (Madsen et al., 2012). This analysis highlights the main underlying gradients of microorganism composition among the 3193 dwellings. Rules of interpretation identify two close variables as positively correlated, two opposing variables as negatively correlated and two orthogonal variables as uncorrelated. The significance of the PCA axes was assessed graphically using the broken-stick model (Legendre and Legendre, 2012).

A cluster analysis was then performed using sample scores of pPCA axes supporting a significant amount of variance according to the broken-stick model (here, the first two axes). Ward's minimum variance clustering method, where the within-group sum of squares is minimized (Borcard et al., 2011) was applied to the matrix of Euclidean distances between sample scores. The gap statistic (Tibshirani et al., 2001) was used to define the number of significant clusters that could be retained from the dendrogram.

The influence of environmental dwelling variables on community composition was assessed through partial redundancy analysis (pRDA). RDA is an extension of PCA that models response variables as a function of explanatory (environmental) variables. Here, explanatory variables constrain the first ordination axes in order to explain the species matrix. In pRDA, dwelling region and month of

sampling were considered as covariables so that their influence was removed prior to assessing the effect of dwelling variables. This procedure allowed examination of the determinants of community variability at a dwelling level once regional and sampling month variability was accounted for. Thirteen explanatory variables related to dwelling characteristics (housework frequency, number of floors, number of windows, use of pesticides, plants, pets, dwelling type, occupation ratio, floor covering in bathroom, living room, kitchen, renovation and if parents were owners of the dwelling) were considered necessary to explain the structure of the microorganism community. Forward selection was used to select explanatory variables. Other pRDAs were performed to assess the influence of socioeconomic variables (mother's country of birth, father's country of birth, educational level, family month income) and parent's health variables (psychological difficulties, parent's asthma and eczema) on the microorganism community. Other variables such as ventilation, date of dwelling construction, and type of heating were excluded from analyses because of the low response rates.

DNA concentrations of qPCR targets were log-transformed prior to the statistical analyses. Statistical analyses and graphical displays were performed using R 3.0.2 (R Development Core Team, 2013) and the 'vegan' (Oksanen et al., 2012), 'mgcv' (Wood, 2006), 'mapdata' and 'maps' (Becker and Wilks, 2013) packages.

Results

Family characteristics

EBRA-Elfe mothers were 33 and fathers 35 years old on average. Most parents (90% of fathers and 91.5% of mothers) were born in France. Fathers not born in France were born in North Africa, other countries in Africa, Eastern Europe, Western Europe, America and

Asia in 2.4%, 2%, 1.1%, 0.8%, 0.3% and 0.2% of cases respectively. Mothers not born in France were born in Africa, North Africa, Western Europe, Eastern Europe, America and Asia in 1.9%, 1.6%, 1.5%, 0.9%, 0.5% and 0.5% of cases respectively. Mothers went to university in 74% of cases, and 93% of fathers had a job.

The monthly family income was 3500€ on average. Three percent of fathers and 4% of mothers had unemployment benefits. One-third of mothers smoked, but 60% of them quit during their pregnancy. Gestational age at birth was between 33 and 42 weeks and 47% of children were girls. EBRA-Elfe dwellings were located in 21 French regions and were distributed in the same proportion as the Elfe total cohort (chi2 test: p-value = 0.24, data not shown). Dwellings in Corsica were removed from our analysis because of their underrepresentation (only 10 dwellings).

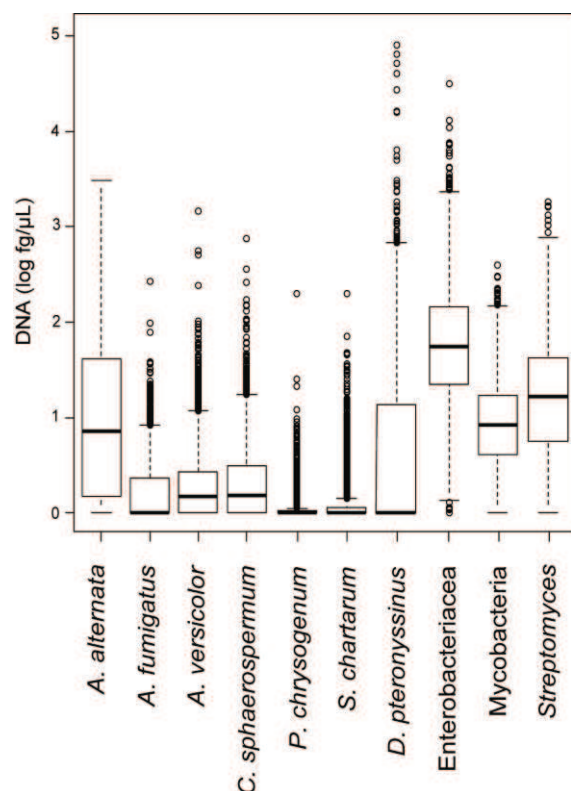


Fig. 1: Boxplots for qPCR target concentrations (in log fg/μL) in the 3193 dwellings

Microorganism community features

Molds were detected by qPCR from 27% (*S. chartarum*) to 88% (*A. alternaria*) of dwellings. Bacteria were detected from 92 to 98 % and the mite in 48% of dwellings. The amount of DNA found in dwellings varied among targets (Fig. 1). The abundance of targets mainly varied between 0 and 1000 fg/μL except for *Enterobacteriaceae* and *D. pteronyssinus* that

exhibited the highest abundances, ten and hundred fold respectively. None of the 10 targets was detected in 22 dwellings (0.7%) and 6-9 targets out of 10 were detected in 76% of dwellings.

Microorganism ordination and classification

The initial dataset was significantly structured by the seasonal effect, the month of sampling explaining 9.7% of the variance. Using pPCA, the variance in community composition among dwellings was efficiently supported by the first two pPCA axes. Axis 1 (PC1) and axis 2 (PC2) accounted respectively for 41.2% and 20.7% of the variance of the dataset (61.9% of the total variance). According to the broken stick model, only these two axes supported a significant amount of variance. *A. alternata* and the dust mite *D. pteronyssinus* are the two most structuring targets that differentiated samples (longer arrow lengths, Fig. 2a). Their distributions are poorly related as indicated by their orthogonal position in the correlation plot. Quite differently, molds and bacteria had related distributions although molds were the less discriminant group of targets. All targets were positively correlated with PC1 indicating that the main gradient obtained by pPCA was a quantitative gradient of contamination. Thus, the higher PC1 score a dwelling has, the more contaminated it is. Complementarily, PC2 allowed discrimination especially among the *A. alternata* dominated community (high PC2 scores) and *D. pteronyssinus*-dominated community (low PC2 scores).

Following the Gap statistic, three groups of dwellings could be defined according to their microorganism composition (Fig. 2b). Nonetheless, because of the large number of dwellings, each group was subdivided into two groups so that dwelling typology could be described in more detail (Fig. 2d). Thus, 6 different profiles can be identified in France.

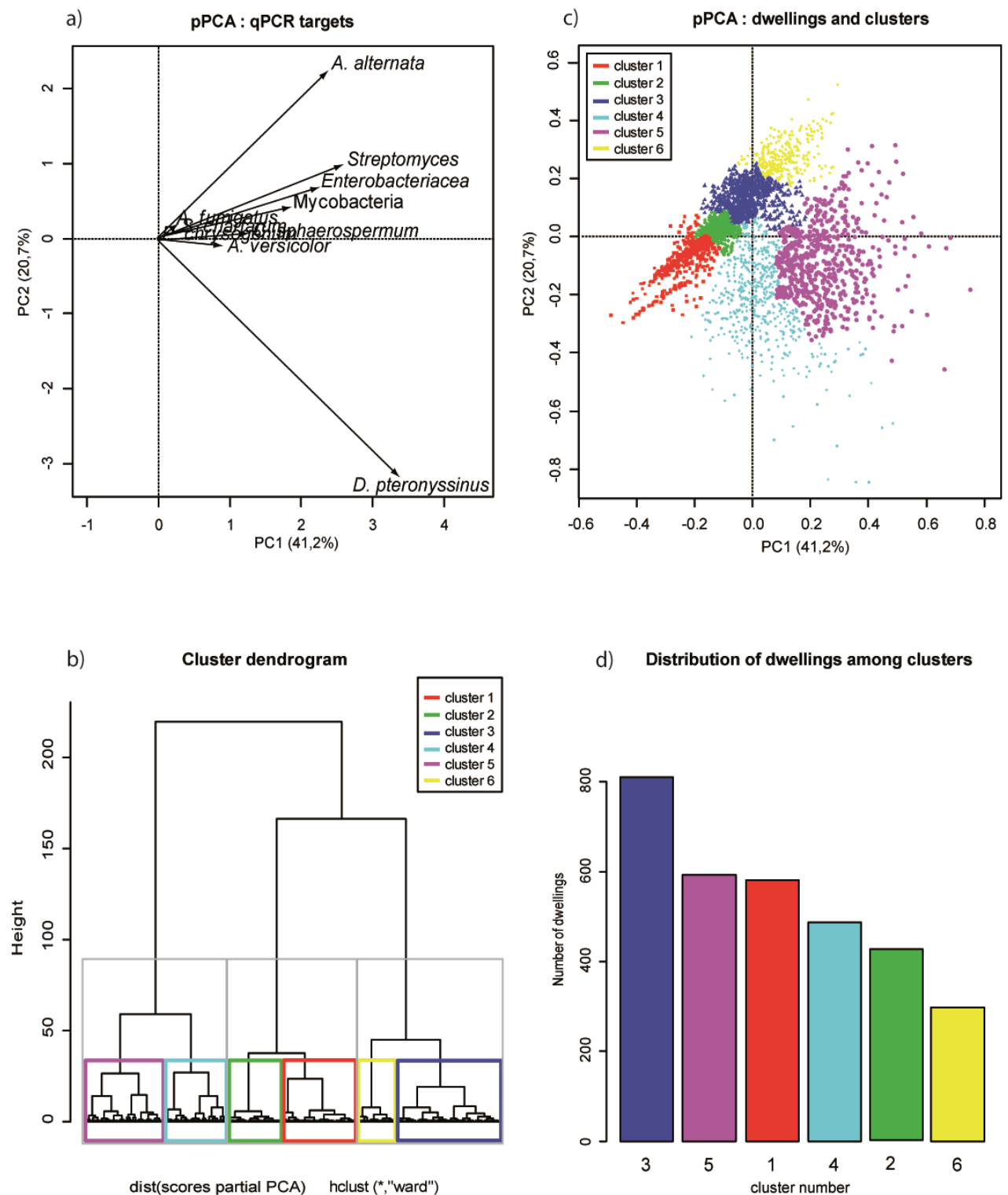


Fig. 2: Partial PCA (pPCA) and clustering analysis. a) Taxa correlation plot of the pPCA analysis. b) Hierarchical clustering constructed from PC1 and PC2 scores of the pPCA plots. c) Correlation plot showing dwelling distribution according to cluster obtained from hierarchical clustering. d) Distribution of dwellings among clusters.

Dwellings in clusters 1 and 2 have the lowest levels of microorganisms (negative coordinates on PC1 in Fig. 2b). Clusters 1, 2, 3 and 6 which follow the *A. alternata* and bacteria gradients (Fig 2a, 2c) contained increasing amounts of microorganisms (cluster 1 < cluster 2 < cluster 3 < cluster 6). Clusters 4 and 5 contained molds, bacteria and *D. pteronyssinus* with a stronger mixed microbial composition in cluster 5. Mean abundance diagrams supporting interpretations of pPCA allow a thorough description of the

microorganism community among the clusters (Fig. 3).

Thus, six different profiles of dwellings, characterized by their composition in microorganisms have been identified (Fig 3):

- Clean profile (cluster 1)
- Bacteria only profile (cluster 2)
- Bacteria and *A. alternata* profile (cluster 3)
- Bacteria and mite profile (cluster 4)
- High level of all microorganisms profile (cluster 5)
- High bacteria and *A. alternata* levels profile (cluster 6)

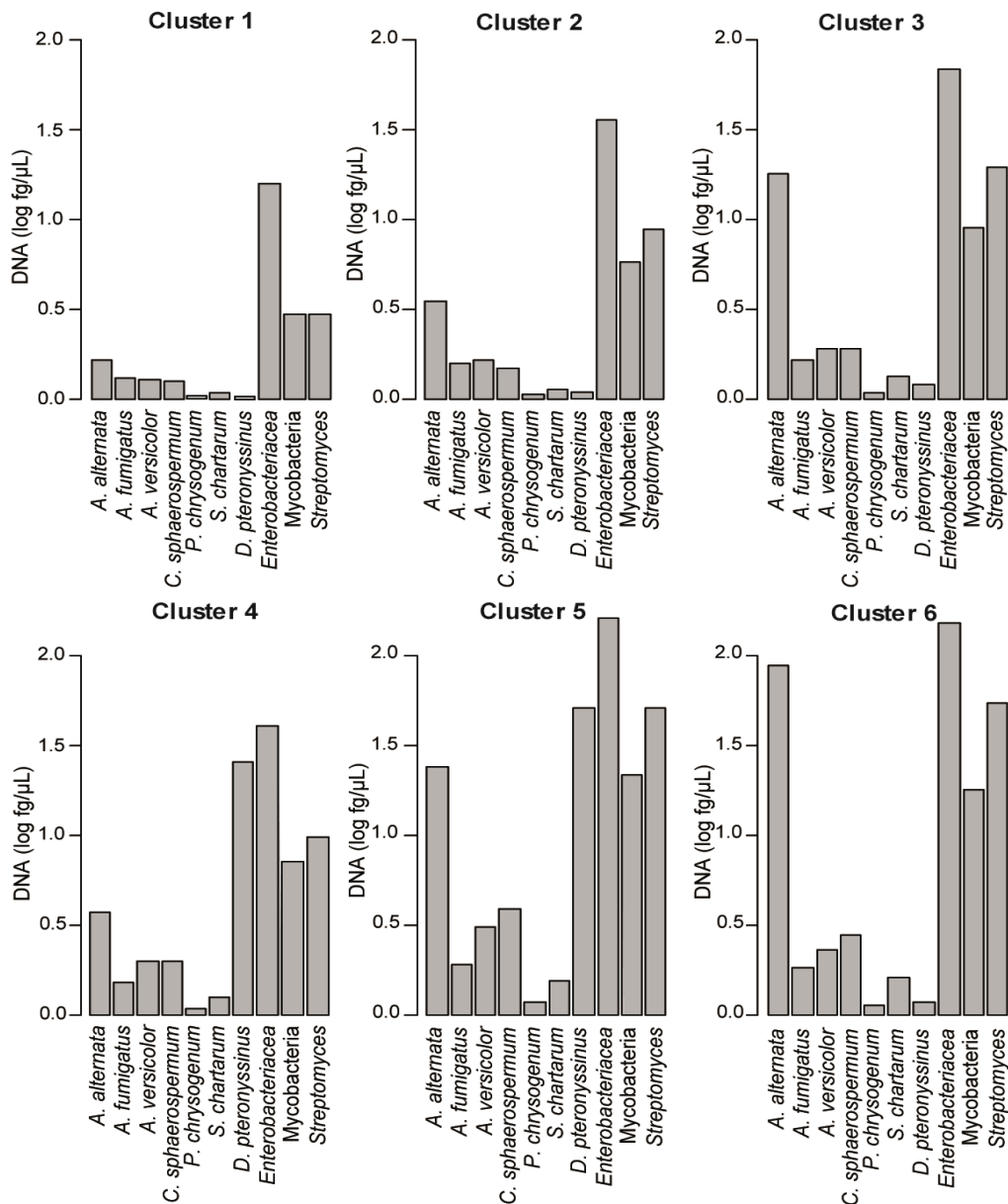


Fig. 3: Mean DNA concentration (log fg/μL) of qPCR targets by cluster.

Spatial clustering

Although all clusters were present in each French region, their occurrence differed greatly (Fig. 4). A dominant cluster was identified in each region. The regional dominant cluster represented from 22% to 47% of the total dwellings (Fig. 4). For one region (Bretagne), two clusters co-dominated. Mild bacteria and *A. alternata* levels profile (cluster 3) was the most dominant cluster in France and dominated more than half of the regions (12/21). Bacteria and mite profile (cluster 4) and mixed strong profile (cluster 5), both with a strong mite component, were dominant in only four and six regions respectively. The few microorganism profile (cluster 1) was found dominant only in Champagne-Ardenne and Nord-Pas-de-Calais.

Bacteria profile (cluster 2), strong bacteria and *A. alternata* levels profile (cluster 6) were never dominant in the French regions. Once plotted on the national territory, the regional distribution of clusters appeared interestingly coherent.

Mild bacteria and *A. alternata* levels profile (cluster 3) was found in central and eastern regions (Fig. 5). Profiles with a mite component were found in western regions with cluster 5 dominant in south-western regions and cluster 4 in the north-western regions. The least contaminated profile (cluster 1) occurred in northern regions. This map (Fig. 5a) was compared to the distribution of wheezing in nursery school children (Delmas et al., 2012) (Fig. 5b).

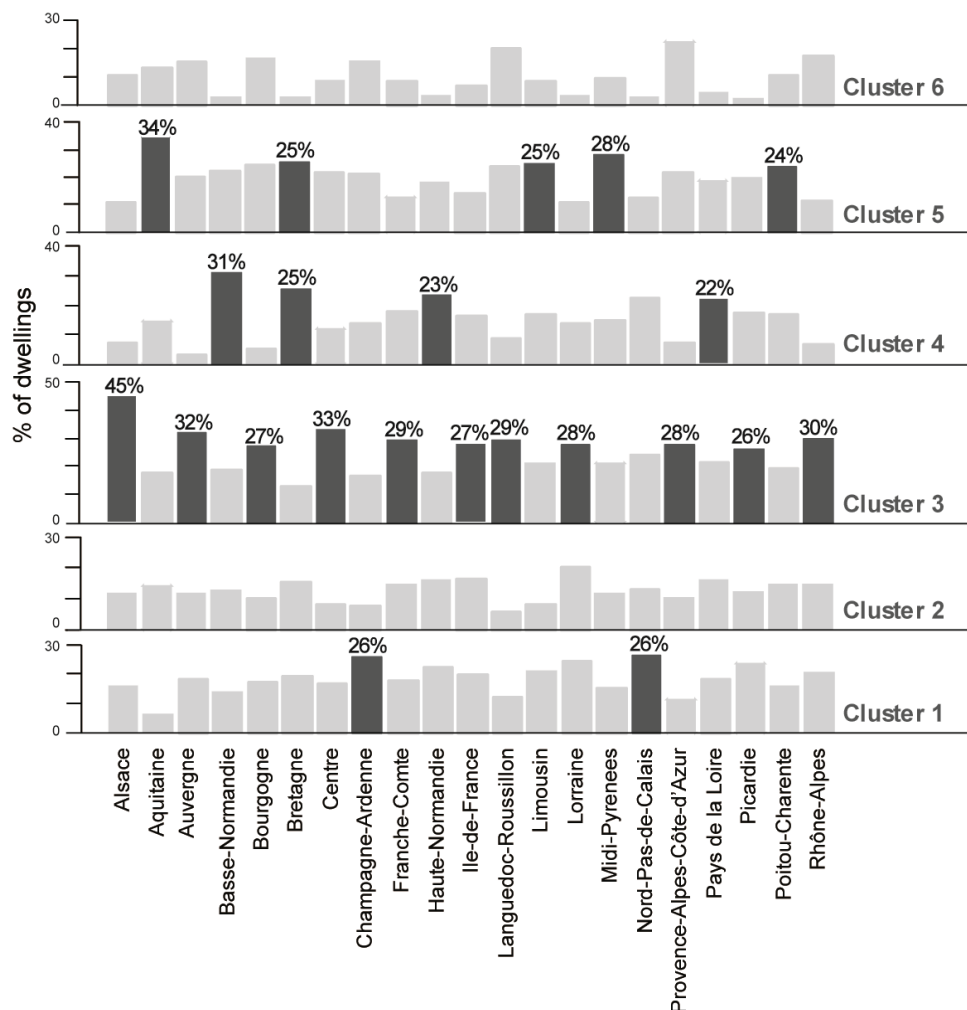


Fig. 4: Dwelling distribution by region and cluster. Dwellings of a dominant cluster in a given region are brightly colored. Others are paler.

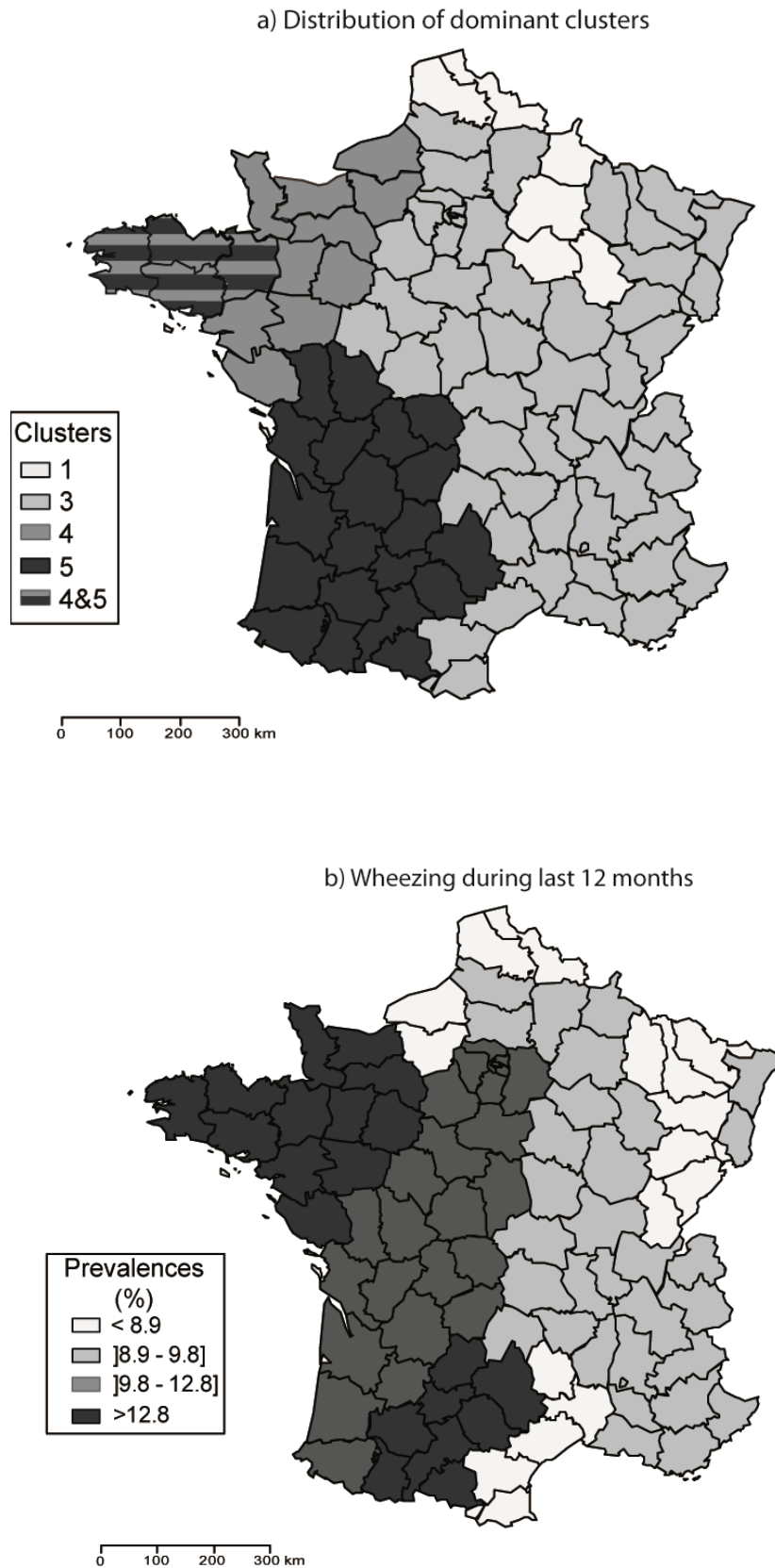


Fig.5 : a) Dominant cluster distribution (from our analysis) and b) wheezing distribution over the last 12 months in a study of 21,140 school children (Delmas et al., 2012).

In-dwelling determinant of microorganism community

Following the spatial analysis, a pRDA was conducted to search for variables within a dwelling that could shape the microorganism community. Considered together, months of sampling and regional coordinates accounted for 15 % of the variance of the dataset. Once these effects were removed, the socioeconomic characteristics and presence of asthmatic parents, who could change the microorganism flora by implementing preventive measures (anti dust mite bedding for example), failed to explain the remaining variability in microorganism community between dwellings ($p > 0.1$).

However, among the 13 dwelling characteristics, three variables, occupation ratio, dwelling type and presence/absence of pets, were significant ($p < 0.01$) in explaining a part of the microorganism distribution in

dwellings; but they only explain a small fraction of the variance (3%). Species association observed in the correlation plot from pRDA differed from that of the pPCA for two reasons: (i) in pPCA, only the month of sampling effect was removed whereas in pRDA, the region of sampling effect was also removed; (ii) moreover, in a pRDA, observed graphical structure is constrained by the explanatory variables, i.e. occupation ratio, dwelling type and presence/absence of pets in the present analysis. *D. pteronyssinus* and *Enterobacteriaceae* and to a lesser extent *C. sphaerospermum* were mainly associated with occupation ratio (Fig. 6), whereas *Streptomyces* and secondarily *Mycobacteria*, *A. alternata* and *A. versicolor* were primarily related to both houses and the presence of pets. Alternatively, apartments with a low occupation ratio and no pets exhibited a low level of microorganisms.

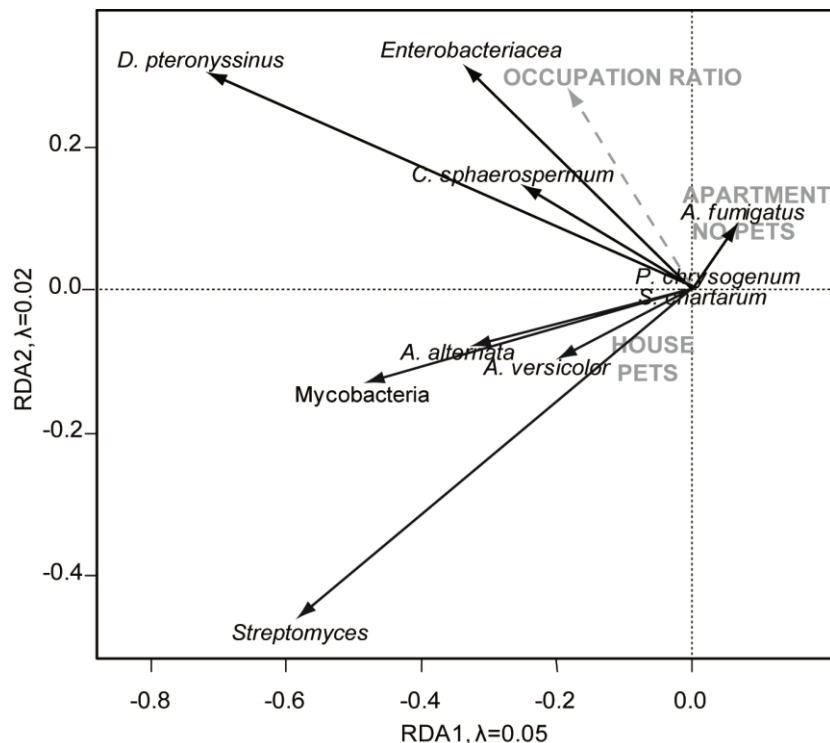


Fig.6 : Partial redundancy analysis (pRDA) plot showing target microorganisms and environmentally significant variables in dwellings ($p < 0.01$). Solid arrows indicate microorganisms while dotted arrow indicates quantitative environmental variable. Other environmental variables without arrows are qualitative variables.

Discussion

Our results showed that the microbial composition of dwellings, assessed using a combination of qPCR assays targeting 10 microorganisms, can be characterised by four entities: three bacteria, *D. pteronyssinus*, *A. alternata*, and five other molds. These community distributions made it possible to divide dwellings into 6 clusters with different profiles and regional distributions. Some dwellings' intrinsic characteristics clearly influence microorganism distribution as well.

The aim of the Elfe project was to follow a 20,000 child cohort representative of French births and thus include one child out of 50 born in France. With 18,300 children, the Elfe study has nearly reached its objectives. As recruitments in the EBRA-Elfe sub cohort resulted in a regional distribution with the same proportions as the Elfe cohort, our study it is not biased with regards to overall births in France. The average monthly family income is 3500€ in our study whereas the French National Institute of Statistics and Economic Studies (INSEE) estimated the average monthly income at 2998€ in 2011. On the other hand, our recruitment seems to be sociologically different from the overall French population. In the EBRA-Elfe cohort, mothers pursued higher education in 74% of cases whereas INSEE estimated that only 35.4% of people aged 25-49 years had university degrees in 2011 in France (INSEE, 2013). Moreover, in our study, only 3% of fathers and 4% of mothers received unemployment benefits while INSEE estimated the unemployment rate to be 6.6% for men and 7.3% for women (15-49 years old) at the end of 2011 (INSEE, 2011).

This study targeted a small number of microorganisms focusing only on ten. However, when characterizing our dwellings, we used 5 very phylogenetically distinct

families of microorganisms (fungi, mites, mycobacteria, *Enterobacteriaceae* and *Actinomycetes*) involved in human respiratory diseases. Moreover, multivariate analysis used in this study allowed us to obtain an overall view of the dwellings' microbial composition, and to observe how targets were distributed with respect to each other, regardless of the month of sampling. In fact, using pPCA makes it possible to summarize in two significantly representative dimensions the complex distribution of ten microorganisms which represents the most robust descriptor of microbiological measurements that we could provide. The 10 targets were simultaneously analyzed and provided essential information about the microbiology of different dwellings. It is for this reason that our study is original with respect to those that target only fungi communities (Reponen et al., 2013; Reponen et al., 2011; Vesper et al., 2007b; Vesper et al., 2007c) or studies which characterized cumulative microorganism exposure (Ege et al., 2011; Karvonen et al., 2014; Roussel et al., 2011).

Bacteria, mites and molds are already known to be involved in respiratory disease, for their negative or positive effects. These three important groups have allowed us to clearly differentiate between different types of housing. In fact, *A. alternata*, bacteria and *D. pteronyssinus* are the targets with the heaviest weight in our analysis. *A. alternata* and *D. pteronyssinus* are the two most important microorganisms structuring our dataset, and the presence of one appeared to be independent of the other (orthogonality in fig. 2a). *A. alternata* and *D. pteronyssinus* are both part of the most described allergens (with grass, cats and dogs) tested with a pricktest (Arshad et al., 2001; Bousquet et al., 2007). Both have been significantly associated

with the severity of asthma (Zureik et al., 2002).

Contrary to other studies (Reponen et al., 2013; Reponen et al., 2011), the origin of the parents and their incomes do not influence the observed microbial composition in homes. We had previously supposed that asthmatic parents would take precautions to reduce the observed microorganism levels in their homes and thus influence the presence or absence of certain fungal species (Reboux et al., 2009). However, no link was found between asthmatic parents and dwelling microbial composition in the present study.

Different communities have been studied based on occupation ratio, dwelling type (house/apartment) and presence/absence of pets. The presence of occupants has already been shown to significantly influence the measured exposure to bioaerosol components (Madsen et al., 2012). Small but densely occupied apartments have been associated with increased mold levels in Eastern France (Roussel et al., 2008). *C. cladosporoides* and *A. fumigatus* are the only two molds which seem to be influenced by the occupation ratio. Pets can influence the presence of home bacteria and molds (Sordillo et al., 2011). In our analysis, pets were associated with *A. alternaria*, *A. versicolor*, Mycobacteria, *Streptomyces*, and also with the type of dwelling.

Region and sampling month variables accounted for 15 % of the variability in the dataset whereas intrinsic characteristics accounted for 3%. It is very important to identify the indoor characteristics of dwellings taking into account the Geographical location.

The involvement of genetic factors in asthma is recognized but these factors alone cannot explain the geographic disparity of the disease's incidence already mentioned above. Vesper's team has quantified 36 molds in

house dust using qPCR and established an Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) to predict asthma in children (Vesper et al., 2007b). Overall, a higher index is found in houses of children with respiratory illness and has been linked to asthma when these children are 7 years old (Reponen et al., 2011). Yet, different targets have been related to asthma in children depending on the study location: *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma viride* in Ohio (Vesper et al., 2006), *Chaetomium globosum*, *A. fumigatus*, *Eurotium* group in North California (Vesper et al., 2007a), *A. niger* and *A. unguis* in Michigan (Vesper et al., 2008b).

In the present study, six clusters, built from pPCA scores, were defined to summarize a "microorganism cocktail" in the dwellings. These groups of dwellings, with different microbiological profiles were located throughout France. However, a mapping of France was carried out taking into account the dominant cluster represented in each region, showing a spatial effect on the microbial composition of dwellings.

As described by authors (Kinney, 2008), climate can influence the indoor distribution of microorganisms. Meteorological data (temperature, rainfall, humidity obtained from Météo France) do not allow us to explain the microorganism distribution on the pPCA (data not shown) but observed patterns of regional dominant cluster lead us to believe that there is indeed an influence on the local level Regional flora, linked to climate, soils, and agriculture may influence indoor microorganisms' flora. Other characteristics such as the architecture of buildings (data not available in our study) or type of heating (not exploitable data because of the low response rate to this question) could explain the observed differences.

This new proxy synthesizing microorganism level and diversity and reflecting the

complexity and interaction of a panel of microorganisms in dwellings, could allow researchers to determine the precise link between microbiological environment and allergic diseases (probably when children are about six years old). In fact, our cluster mapping could be compared to asthma and the wheezing prick test or the prevalence of specific IgE results.

A study of about 21 140 children in nursery schools throughout France showed different prevalences of asthma and wheezing and notably a difference between the Nord, Western and Southwestern regions and those of the East and Center (Delmas et al., 2012). In our study, we observed the same geographical pattern in the dominant profile distributions. The regions most affected by nursery school children wheezing were located in western France, and our most contaminated clusters (cluster 4 and 5) were located in the same geographical area. On the two maps (clusters and wheezing), both the Bretagne and southwest regions are very different from the others.

Our new proxy, profiles with a cluster approach and integrating a regional effect, seems, therefore, appropriate and promising. The results obtained through the simultaneous analysis of 10 microorganisms from 3 different types (bacteria, mold and mites) make it possible to analyze the indoor air biological pollutants of homes and provide a picture of the complex microbial composition in a large number of French dwellings throughout the country. In the future it will be easier to include new results from new samplings in this pPCA (without modifying the initial data set) to characterize new dwellings in the same way, with 1 of the 6 profiles.

Available samples have been kept and could be used for other qPCR target analyses in the near future to further develop and enhance

our conclusions. For example, the *D. farinae* target, created in our laboratory (Roussel et al., 2013) could also be used. New EDC will be made and distributed to families to sample dwellings again when children are 3 1/2 years old and will enable us to monitor the children over time. Thus, we hope to obtain the most continuous and detailed approach possible of analyzing biological composition which will then help us to explain the occurrence of respiratory diseases in children. These diseases will develop in the near future in some children of the Elfe cohort and they will show us to what extent our approach can be predictive of respiratory disease.

Aknowledgements

We are grateful to the ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) for the financial support (EST-2010-40) and the Franche-Comté region for PhD grant and equipment funds. We thank the Elfe team (Institut national d'études démographiques (Ined), Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Etablissement français du sang (EFS), Institut de veille sanitaire (InVS), Institut national statistiques et études économiques (Insee), Direction générale de la santé (DGS, Ministère en charge de la santé), Direction générale de la prévention des risques (DGPR, Ministère en charge de l'environnement), Direction de la recherche des études, de l'évaluation et des statistiques (Drees, Ministère en charge de la santé et de l'emploi), Caisse nationale des allocations familiales (Cnaf)) and especially Cécile Zaros and Marie-Noëlle Dufourg for their logistic assistance. The RECONAI platform was supported by the French research agency (Agence Nationale de la Recherche, ANR-11-EQPX-0038 program). We also thank Pamela Albert (CLA, Besançon) for her editorial assistance and Météo France for weather data.

Conflict of interest

The authors have no competing interests.

References

- Agarwal, R., Gupta, D., 2010. Severe asthma and fungi: current evidence. *Medical Mycology*. 49, S150-S157.
- Arshad, S. H., et al., 2001. Sensitization to Common Allergens and Its Association With Allergic Disorders at Age 4 Years: A Whole Population Birth Cohort Study. *Pediatrics*. 108, e33-e33.
- Becker, R. A., Wilks, A. R., mapdata: Extra Map Databases. R package version 2.2-2, 2013.
- Borcard, D., et al., 2011. Numerical ecology with R.
- Bornehag, C. G., et al., 2004. Dampness in buildings as a risk factor for health effects, EUROEXPO: a multidisciplinary review of the literature (1998-2000) on dampness and mite exposure in buildings and health effects. *Indoor Air*. 14, 243-57.
- Bousquet, J., et al., 2013. Pooling birth cohorts in allergy and asthma: European Union-funded initiatives - a MeDALL, CHICOS, ENRIECO, and GA(2)LEN joint paper. *Int Arch Allergy Immunol*. 161, 1-10.
- Bousquet, P. J., et al., 2007. Number of allergens to be tested to assess allergenic sensitization in epidemiologic studies: results of the European Community Respiratory Health Survey I. *Clin Exp Allergy*. 37, 780-7.
- Bundy, K. W., et al., 2009. Household airborne *Penicillium* associated with peak expiratory flow variability in asthmatic children. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 103, 26-30.
- Delmas, M. C., et al., 2012. Prévalence et contrôle de l'asthme chez le jeune enfant en France. *Revue des Maladies Respiratoires*. 29, 688-696.
- Ege, M. J., et al., 2011. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*. 364, 701-9.
- Frankel, M., et al., 2012. Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure. *Indoor air*.
- Garrett, et al., 1998. Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children. *Clinical & Experimental Allergy*. 28, 459-467.
- Haugland, R. A., et al., 2004. Quantitative PCR Analysis of Selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* Species. *Systematic and Applied Microbiology*. 27, 198-210.
- INSEE, Le taux de chômage augmente au troisième trimestre 2011. <http://www.insee.fr/fr/themes/info-rapide.asp?id=14&date=20111201>, 2011.
- INSEE, Tableaux de l'économie française. Niveaux de formation. http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?ref_id=T13F104, 2013.
- Karvonen, A. M., et al., 2014. Quantity and diversity of environmental microbial exposure and development of asthma: a birth cohort study. *Allergy*.
- Keil, T., et al., 2006. European birth cohort studies on asthma and atopic diseases: II. Comparison of outcomes and exposures--a GA2LEN initiative. *Allergy*. 61, 1104-11.
- Kinney, P. L., 2008. Climate Change, Air Quality, and Human Health. *American Journal of Preventive Medicine*. 35, 459-467.
- Legendre, P., Legendre, L., 2012. Numerical ecology. Elsevier.
- Madsen, A. M., et al., 2012. Sampling, extraction and measurement of bacteria, endotoxin, fungi and inflammatory potential of settling indoor dust. *Journal of Environmental Monitoring*. 14, 3230-3239.

ARTICLE SOUMIS A STOTEN

- Noss, I., et al., 2008. Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air. *Appl Environ Microbiol.* 74, 5621-7.
- Oksanen, J., et al., 2012. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-5.
- R Development Core Team, 2013. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- Reboux, G., et al., 2009. Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air.* 19, 446-53.
- Reponen, T., et al., 2013. Family and home characteristics correlate with mold in homes. *Environ Res.* 124, 67-70.
- Reponen, T., et al., 2012. Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. *J Allergy Clin Immunol.* 130, 639-644.e5.
- Reponen, T., et al., 2011. High environmental relative moldiness index during infancy as a predictor of asthma at 7 years of age. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology.* 107, 120-126.
- Riedler, J., et al., 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet.* 358, 1129-33.
- Rintala, H., Nevalainen, A., 2006. Quantitative measurement of streptomycetes using real-time PCR. *Journal of Environmental Monitoring.* 8, 745-749.
- Roussel, S., et al., 2008. Characteristics of dwellings contaminated by moulds. *J Environ Monit.* 10, 724-9.
- Roussel, S., et al., 2013. Detecting and quantifying mites in domestic dust: A novel application for real-time PCR. *Environment International.* 55, 20-24.
- Roussel, S., et al., 2011. Exposure to moulds and actinomycetes in Alpine farms: a nested environmental study of the PASTURE cohort. *Environ Res.* 111, 744-50.
- Salo, P. M., et al., 2006. Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 118, 892-898.
- Scherer, E., et al., 2014. qPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dust from dwellings in large cohort studies. *Science of The Total Environment.* 466-467, 716-724.
- Schram-Bijkerk, D., et al., 2005. Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study. *Clin Exp Allergy.* 35, 1272-8.
- Sen, K., Asher, D. M., 2001. Multiplex PCR for detection of Enterobacteriaceae in blood. *Transfusion.* 41, 1356-1364.
- Sordillo, J. E., et al., 2011. Home characteristics as predictors of bacterial and fungal microbial biomarkers in house dust. *Environ Health Perspect.* 119, 189-95.
- Tibshirani, R., et al., 2001. Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology).* 63, 411-423.
- Tischer, C., et al., 2011. Association between domestic mould and mould components, and asthma and allergy in children: a systematic review. *European Respiratory Journal.* 38, 812-824.
- Torvinen, E., et al., 2006. Mycobacteria and Fungi in Moisture-Damaged Building Materials. *Applied and Environmental Microbiology.* 72, 6822-6824.
- Vandentorren, S., et al., 2009. Rationales, design and recruitment for the Elfe longitudinal study. *BMC Pediatrics.* 9, 58.
- Vesper, S., et al., 2007a. Quantitative PCR analysis of molds in the dust from homes of asthmatic children in North Carolina. *J Environ Monit.* 9, 826-30.
- Vesper, S., et al., 2008. Higher Environmental Relative Moldiness Index (ERMIsm) values measured in Detroit homes of severely asthmatic children. *Sci Total Environ.* 394, 192-6.

ARTICLE SOUMIS A STOTEN

- Vesper, S., et al., 2007b. Development of an Environmental Relative Moldiness index for US homes. *J Occup Environ Med.* 49, 829-33.
- Vesper, S. J., et al., 2007c. Relative moldiness index as predictor of childhood respiratory illness. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 17, 88-94.
- Vesper, S. J., et al., 2006. Specific molds associated with asthma in water-damaged homes. *J Occup Environ Med.* 48, 852-8.
- von Mutius, E., 2007. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology.* 212, 433-9.
- Wood, S., 2006. Generalized additive models: an introduction with R. CRC press.
- Zureik, M., et al., 2002. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ.* 325, 411-4.

CHAPITRE 3

**Environnement fongique de logements et risque d'ABPA chez des
patients atteints de mucoviscidose :**

Étude TIARÉ

CHAPITRE 3

1. Contexte

L'ABPA est une forme d'allergie pulmonaire sévère et complexe qui touche les patients avec de l'asthme atopique ou atteints de mucoviscidose. Elle se traduit par des symptômes allergiques, avec une hypersensibilité aux allergènes d'*A. fumigatus* et peut évoluer en lésions pulmonaires graves. L'ABPA se distingue des maladies allergiques par la présence simultanée d'IgE et d'IgG. Elle toucherait 2,5% des 200 millions d'adultes asthmatiques dans le monde (Denning et al., 2013) et 0,95 à 10,9% des patients atteints de mucoviscidose (Pihet et al., 2009) selon les études.

Les patients atteints de mucoviscidose peuvent en effet être colonisés par des bactéries comme *P. aeruginosa* et *S. aureus*, et par des champignons filamenteux comme en témoigne la Figure 15.

Une chronologie de colonisation peut être observée. Les enfants atteints de mucoviscidose sont d'abord colonisés par *S. aureus* et *P. aeruginosa* et ensuite par les champignons filamenteux *A. fumigatus* et *S. apiospermum* (Pihet et al., 2009). Mais *A. fumigatus* est le champignon le plus souvent isolé dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose.

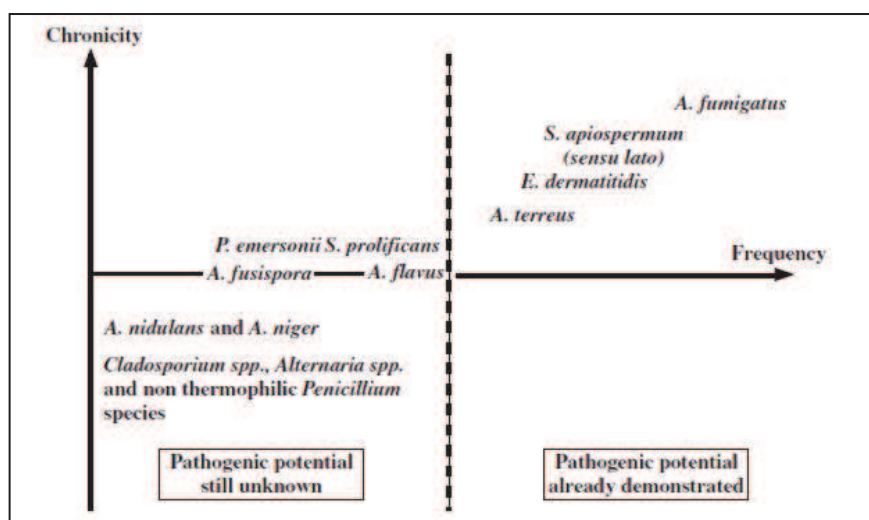


Figure 15 : Champignons filamenteux retrouvés dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose. (Pihet et al., 2009)

Le diagnostic d'ABPA chez les patients atteints de mucoviscidose est difficile. Des critères indispensables pour le diagnostic d'ABPA ont été défini par la conférence de consensus de la fondation pour la mucoviscidose (Stevens et al., 2003). Le patient doit présenter au minimum des signes cliniques, des IgE totaux supérieurs à 500 IU/mL, une réaction cutanée ou des IgE spécifiques à *A. fumigatus* et enfin un des critères suivants : une imagerie compatible, des précipitines ou des IgG à *A. fumigatus*.

CHAPITRE 3

Concernant l'exposition de ces patients à l'environnement intérieur, très peu d'études ont été conduites jusqu'à ce jour.

Une étude menée dans six logements de patients ayant eu des expectorations positives à *S. apiospermum* (prélèvements air, eau, surface, terre des plantes) a montré que les plantes intérieures pouvaient être une source de contamination à *S. apiospermum* (Sidot et al., 2007).

Une étude publiée en 2010 (Nagano et al., 2010) s'est intéressée à la contamination fongique des services accueillant les patients atteints de mucoviscidose. Ainsi, 62 isolats fongiques issus de l'environnement ont été identifiés. Six ont été détectés à la fois dans les expectorations des patients et dans l'environnement du service (Figure 16). Les auteurs ont ainsi montré que des moisissures viables se trouvaient à proximité des patients atteints de mucoviscidose.

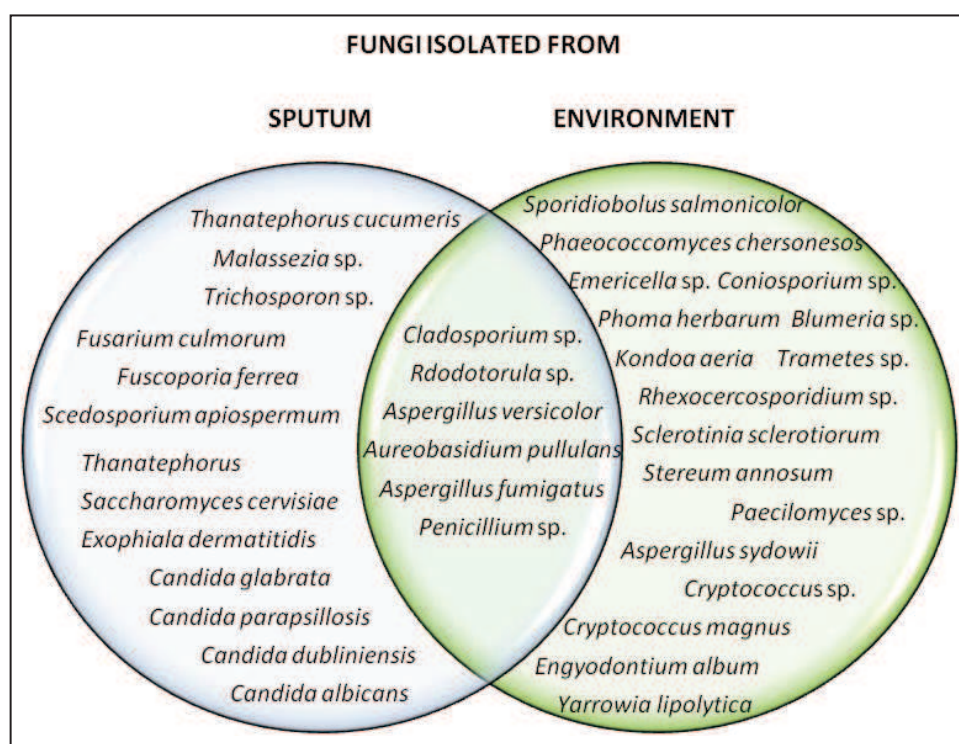


Figure 16 : Comparaison entre moisissures isolées dans le service où sont hospitalisés les patients atteints de mucoviscidose et dans les expectorations de ces patients (Nagano et al., 2010)

Enfin, une équipe de Rennes a évalué récemment l'exposition fongique au domicile des patients atteints de mucoviscidose (Poster de Pricope et al. SFMM Reims 2014). Des prélèvements humides de surface ont été réalisés aux domiciles de 34 patients, mais aucun lien entre exposition et pathologies aspergillaires diagnostiquées n'a pu être mis en évidence.

CHAPITRE 3

2. Présentation de l'étude TIARÉ

Au CHU de Besançon, des logements de patients atteints de mucoviscidose suivi dans le service de pneumologie, sont inclus depuis juin 2011 dans le protocole TIARÉ (Test ELISA IgG Antigènes REcombinants Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique/Mucoviscidose). Cette étude clinique, radiologique, fonctionnelle et sérologique de patients adultes atteints de mucoviscidose, est réalisée dans le cadre soit du suivi médical standard des patients, soit du suivi de ceux en pré ou post-greffe. Cette étude est menée en collaboration avec le service du Centre Régional Contre la Mucoviscidose (Dr Bénédicte RICHAUD-THIRIET et Pr. Jean-Charles DALPHIN).

Un des objectifs de l'étude TIARÉ est de mettre en corrélation l'évolution de l'ABPA avec les conditions du logement et notamment les niveaux et la nature des contaminations fongiques auxquels les patients sont exposés.

Aucune visite à domicile n'a lieu pour cette étude. Les prélèvements environnementaux en vue de l'analyse microbiologique du logement se font par des EDC. Ces EDC sont analysés par culture et par qPCR. Un questionnaire similaire à celui pour l'étude FIQCS a été rempli par le patient et renvoyé par la poste avec le capteur.

Une attention particulière a été portée sur les espèces suivantes qui ont été recherchées par culture: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *Exophiala dermatidis*, *S. apiospermum*, *S. prolificans*. Deux espèces, *A. fumigatus* et *E. dermatidis*, ont été recherchés par qPCR.

3. Principaux résultats

Seize logements de patients atteints de mucoviscidose ont été analysés. Quatre patients (P13, P14, P15 et P16 dans le Tableau 11) présentaient les critères minimum de classification de l'APBA selon les recommandations de la publication de Stevens (Stevens et al., 2003), à savoir des IgE spécifiques à *A. fumigatus*, des IgE totaux supérieurs à 500 IU/mL, des précipitines à *A. fumigatus* ou une radiologie compatible.

Deux autres patients, P5 et P10 étaient en rémission d'APBA au moment de l'inclusion. Sept patients, présentant des antigènes métaboliques ou somatiques à *A. fumigatus* ont été classés en patients sensibilisés et 5 patients ne présentaient ni ABPA ni sensibilisation.

Tableau 11 : Classification des patients selon les critères de diagnostic d'ABPA

Status	Patients	Age (gender)	<i>A. fumigatus</i> specific IgE level (KUI/l)	Total IgE level (IU/mL)	Radiographic criteria	Metabolic antigens of <i>A. fumigatus</i> (arcs)	Somatic antigens of <i>A. fumigatus</i> (arcs)
No ABPA	P1	19 (M)	<0,1	2,9	TT opacities ²	0	1
	P2	32 (F)	<0,1	20,9	Mucoid impaction , Nodules, TT opacities ²	1	0
	P3	27 (M)	2,3	263	Nodules, TT opacities ²	0	0
	P4	29 (M)	<0,1	<20	TT opacities ²	1	1
	P5 ¹	20 (M)	0,2	54,9	Nodules, TT opacities ²	0	0
Sensitized	P6	17 (M)	NA	26	Nodules, TT and FIG opacities ^{2,3}	2	3
	P7	23 (M)	<0,1	111	Nodules, TT opacities ²	5	4
	P8	25 (F)	0,7	381	Mucoid impaction , TT opacities ²	2	3
	P9	25 (F)	<0,1	<2	No signs	5	4
	P10 ¹	43 (M)	0,2	28,6	Nodules, TT and FIG opacities ^{2,3}	2	3
	P11	35 (M)	<0,1	18,7	Nodules, TT opacities ²	3	3
	P12	22 (M)	<0,1	3986	TT opacities ²	5	5
ABPA (Stevens et al., 2003)	P13	18 (M)	43,1	789	Bronchiectasis, Mucoid impaction , TT opacities ²	6	5
	P14	49 (F)	17,2	976	TT opacities ²	5	3
	P15	38 (F)	39	1871	Mucoid impaction , TT opacities ²	2	2
	P16	53 (M)	10,6	2023	Infiltrates , Nodules, TT opacities ²	2	2

Highlighted boxes correspond to the required criteria

¹ ABPA remission patients when they were included in the study and diagnosed with ABPA in 2013 and 2014.

²TT opacities = Tram-Track opacities

³FIG opacities = Finger In Glove opacities

CHAPITRE 3

Les résultats d'analyse des EDC par culture sont présentés en Figure 17. Les niveaux de contamination en moisissures sont dans les mêmes ordres de grandeur que ceux obtenus à partir des EDC de l'étude FIQCS (logements ayant une même situation géographique). *A. fumigatus* n'a été détecté en culture que dans 5 des 16 logements, 4 logements de patients sensibilisés (P6, P7, P8 et P9) et un logement de patient ABPA (P14). Aucun *Scedosporium* n'a été mis en évidence.

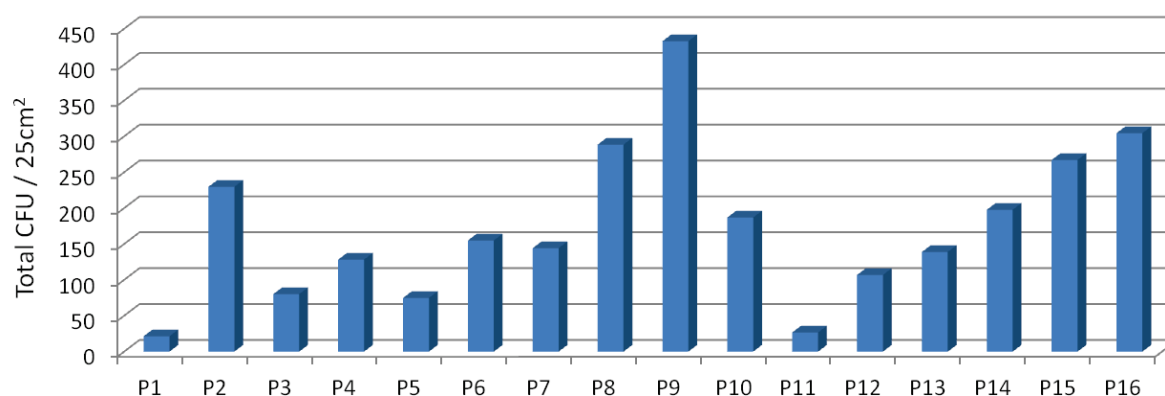


Figure 17 : Résultats des analyses obtenues par culture des lingettes des EDC
(Toutes moisissures confondues)

E. dermatitidis n'a été détectée par qPCR que dans trois logements. Les résultats pour la qPCR *A. fumigatus* sont présentés dans le Tableau 12.

Trois catégories de patients ont ainsi été reportées dans ce tableau :

- Patients avec ABPA (Stevens et al., 2003)
- Patients avec ABPA et patients sensibilisés (ayant des antigènes positifs pour *A. fumigatus*)
- Patients avec ABPA et ABPA en rémission

Une étude antérieure, réalisée au laboratoire, a montré que 92% des prélèvements d'air effectués dans des logements avaient des concentrations fongiques qui restaient constantes lors d'échantillonnages effectués à nouveau 3 à 7 mois plus tard (Reboux et al., 2009). La contamination mesurée par les EDC, resté deux mois dans les chambres des patients, reflète certainement elle aussi un environnement qui serait stable dans le temps. L'environnement des patients en rémission est donc probablement proche de celui auquel ils étaient exposés lorsque l'ABPA a été diagnostiquée. Les patients en rémission ont donc été classés en ABPA pour certaines analyses statistiques.

Les analyses statistiques ont ainsi été réalisées suivant 3 groupes de patients (ABPA au sens de la classification, patients sensibilisés et/ou ABPA et ABPA en rémission) afin de voir si les quantités d'*A. fumigatus* détectées en qPCR variaient suivant le type de patient.

Les trois patients ayant les plus grandes quantités d'*A. fumigatus* détectées par qPCR (de 6,37 à 6,53 fg/ μ L) sont trois patients avec ABPA selon la classification de 2003 (Tableau 12).

CHAPITRE 3

Tableau 12 : Résultats qPCR *A. fumigatus* et classification des patients

code	qPCR <i>A. fumigatus</i> (fg/ μ L)	ABPA	ABPA + sensitized patients	ABPA + remission patients
P15	6,53	×	×	×
P14	6,40	×	×	×
P13	6,37	×	×	×
P5	5,44			×
P10	4,29		×	×
P16	3,44	×	×	×
P9	2,46		×	
P8	2,11		×	
P11	2,10		×	
P6	1,91		×	
P2	1,17			
P7	0,90		×	
P4	0,52			
P3	0,39			
P12	0,07		×	
P1	0,00			
TOTAL		4	11	6

La comparaison des données de qPCR entre les différents groupes a donné les boxplots en Figure 18. Les différences des boxplots en A et en C étaient statistiquement significatives selon les modèles linéaires généralisés réalisés (p -values = 0,001 et $4,2.10^6$ pour A et C respectivement). Des résultats de qPCR *A. fumigatus* sont donc supérieurs dans les logements de patients ABPA (classification + rémission). Ces observations devront être confirmées avec un nombre plus important de patients inclus.

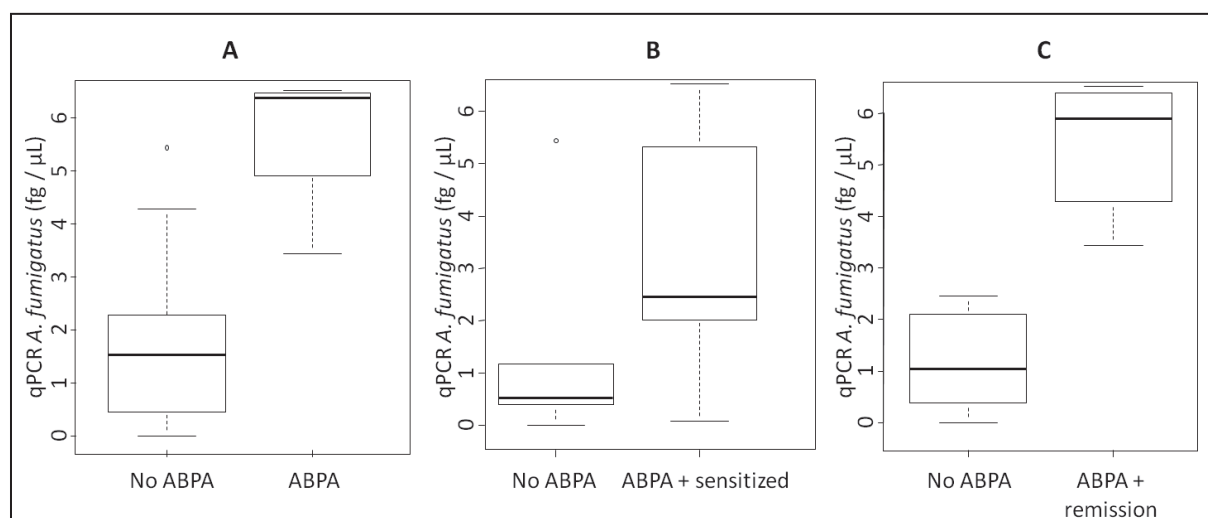


Figure 18 : Boxplots des données qPCR *A. fumigatus* en fonction des différents groupes de patients

CHAPITRE 4

Articles en relation avec la thèse

CHAPITRE 4

La méthode qPCR pour la détection d'ADN de mucorales validée dans l'étude FIQCS a été utilisée pour le développement d'une technique de diagnostic des mucormycoses (IFI) chez les patients immunodéprimés. Les résultats de ces 3 qPCR mucorales, passées sur 10 sérums de patients d'hématologie atteints de mucormycoses ont été valorisés dans l'article suivant.

1. Article présentant les résultats des qPCR mucorales pour le diagnostic de mucormycoses

Titre:

Quantitative PCR detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients

Auteurs:

Laurence MILLON, Fabrice LAROSA, Quentin LEPILLIER, Faezeh LEGRAND, Steffi ROCCHI, Etienne DAGUINDEAU, Emeline SCHERER, Anne-Pauline BELLANGER, Joel LEROY, Frederic GRENOUILLET

Journal:

Clinical Infectious Disease, accepté pour publication le 11 février 2013

CHAPITRE 4

Avec l'étude FIQCS, nous avons analysé la contamination aux domiciles des patients immunodéprimés. Parallèlement, la contamination des couloirs du CHU est analysée en routine. Une autre étude concernant la contamination fongique et bactérienne a été réalisée dans des cabinets médicaux pour avoir un suivi complet de l'environnement intérieur qui pouvaient accueillir des patients immunodéprimés. Ce travail a fait l'objet de la publication suivante.

2. Article présentant les résultats de la contamination fongique et bactérienne de 30 cabinets médicaux Franc-comtois.

Titre:

Contamination fongique et bactérienne de 30 salles de consultation de cabinets médicaux en Franche-Comté

Auteurs:

Gabriel REBOUX, Steffi ROCCHI, Laurence MILLON, Daniel TALON, Xavier BERTRAND

Journal:

Journal de mycologie médicale, accepté pour publication le 14 mai 2013

DISCUSSION

Bilan des différentes études menées

DISCUSSION

Pour les risques infectieux des patients immunodéprimés, l'étude menée a montré qu'un fort pourcentage d'*A. fumigatus/flavus* par rapport aux moisissures totales (>15%) au domicile du patient était relié avec le développement d'AI. L'intérêt des mesures au domicile des patients est renforcé avec les résultats obtenus lors de cette étude. Une évaluation du pourcentage d'*A. fumigatus/flavus* par rapport aux moisissures totales, et non une évaluation de la flore fongique totale seulement, semble être adaptée pour évaluer le risque des patients immunodéprimés chroniques qui rentrent à domicile.

L'approche proposée pour évaluer la composition microbiologique de logements d'enfants, et le lien avec le développement de l'asthme, cible plusieurs micro-organismes. Elle a mis en évidence que l'habitat constituait un "cocktail" complexe d'organismes vivants ou morts, capables d'émettre des fragments, toxines, allergènes et COV et que cet habitat était différent suivant sa localisation géographique en France. Il faudra attendre le développement des premières pathologies respiratoires allergiques des enfants afin d'évaluer si les profils définis, résumant une contamination multiple, peuvent permettre d'identifier des logements plus à risque. Néanmoins, la répartition régionale des profils dominants de logements est d'ores et déjà semblable à la répartition des sifflements respiratoires qui a pu être observée chez des enfants français scolarisés en maternelle (Delmas et al., 2012).

Enfin, pour les patients atteints de mucoviscidose, à notre connaissance, aucune étude sur l'exposition fongique à domicile n'a pu montrer de lien entre exposition et risque d'ABPA. Dans l'étude TIARÉ, les domiciles des patients avec ABPA présentent les plus fortes quantités d'*A. fumigatus* détectées par qPCR.

1. Critique des méthodes utilisées

Les résultats de qPCR aux domiciles des patients d'hématologie, comparés aux résultats de culture, n'ont pas permis de discriminer les patients ayant développé une AI/IFI des autres. Ceci peut s'expliquer par le fait que les méthodes "conventionnelles" de détection de l'ADN ne permettent pas de différencier les spores viables (capables de coloniser et infecter les patients) des spores non viables. Dans notre cas, les résultats obtenus par qPCR entraînent donc une surestimation des *A. fumigatus* pouvant réellement induire des AI. Certains travaux ont utilisé le propidium monoazide pour différencier les cellules viables et non viables (Nocker and Camper, 2009). Cet intercalant d'ADN pénètre dans les cellules endommagées et clive l'ADN génomique, qui n'est ensuite plus amplifié par qPCR. Des débuts d'expérimentation ont été menés lors de ce travail de thèse mais, comme cela a

déjà été mentionné dans certaines publications (Fittipaldi et al., 2011; Vesper et al., 2008a), ces techniques ont des limitations importantes. Les témoins négatifs utilisés étaient des solutions de spores d'*A. fumigatus* (10^3 spores/mL) chauffées à 100°C pendant 15 minutes pour faire éclater les cellules. Nous supposons ainsi, que ces spores avec paroi endommagée, ne seraient plus détectées en qPCR. Les spores de ces solutions ne poussaient effectivement plus en culture mais ont montré des signaux de qPCR identiques aux solutions non chauffées. Des faux positifs et des faux négatifs ont en effet déjà été décrits : certaines cellules non viables avec membrane intacte étaient détectées et des cellules viables avec membrane endommagée non quantifiées (Fittipaldi et al., 2011).

De plus, les échantillons traités au PMA inhibaient dans notre cas la détection de *Geotricum candidum* par qPCR, rajouté aux échantillons au moment de l'extraction comme témoin d'inhibition. Cette technologie doit donc encore être étudiée pour améliorer ses performances.

L'espèce *P. chrysogenum* a été retrouvée en qPCR dans 42% des logements ELFE alors que *P. chrysogenum* est souvent défini comme étant une des moisissures les plus fréquemment isolées dans les logements. Nous nous sommes donc tout d'abord demandé si cette qPCR permettait bien de détecter tous les *P. chrysogenum* (les tests de spécificité et sensibilité n'étant validés qu'avec un isolat de référence). Mais cette hypothèse a pu être rejetée car 20 isolats de *P. chrysogenum* identifiés par Malditof et séquençage ont bien été amplifiés par la qPCR utilisée dans l'étude EBRA ELFE. Une 2^{ème} hypothèse est donc avancée : Les *P. chrysogenum* sont peut-être plus résistants lors des prélèvements par impaction par exemple et/ou présenteraient des avantages compétitifs par rapport aux autres espèces sur les milieux de culture. Cette hypothèse est appuyée par des premiers essais de métagénomique réalisés également lors de cette thèse (description des essais et premiers résultats en annexe). Le genre le plus présent dans les logements n'étant pas le genre *Penicillium* mais plutôt les genres *Cladosporium*, *Galactomyces*, *Cryptococcus*, *Epicoccum*, *Wallemia* et *Alternaria*. Ces résultats rejoignent ceux d'autres travaux utilisant les techniques de NGS. *Chalara longipes*, *Aureobasidium pullulans*, *Malassezia globosa*, *Cladosporium cladosporioides* sont les espèces qui ont été le plus largement retrouvées par pyroséquençage (Nonnenmann et al., 2012). Dans cette même publication, les auteurs ont comparé la détection de 18 espèces par qPCR (principe de l'ERMI) et par pyroséquençage dans 50 échantillons de poussière aspirée. *P. chrysogenum* groupe 2 a par exemple été classé 12^{ème} en qPCR (en fonction de sa concentration moyenne) et 11^{ème} en pyroséquençage (en quantification relative). Ces approches de métagénomique, En inventoriant la contamination de logements, pourront permettre de mieux cibler les microorganismes qui devront être quantifiés par qPCR.

2. Intérêt des mesures pour évaluer l'exposition

Quelques soient les études menées lors de cette thèse (FIQCS, TIARÉ ou EBRA ELFE) la contamination n'a pas pu être appréhendée uniquement via le biais de questionnaires. Les conclusions des études ayant montré des contaminations plus importantes selon les revêtements des murs des logements (Andersen et al., 2011; Hyvärinen et al., 2002) ne sont pas applicables dans notre cas. De plus, lors des visites de l'étude FIQCS (seule étude pour laquelle les prélèvements à domicile ont nécessité un déplacement), les quelques logements ayant des surfaces moisies n'étaient pas ceux qui présentaient les plus fortes contaminations. Il a été démontré que l'humidité favorisait le développement des moisissures mais la présence de moisissures n'est pas toujours reliée à une humidité excessive au sein des logements. Les mesures à domicile semblent donc essentielles pour évaluer l'exposition des personnes dans leur environnement intérieur.

3. Environnement et risque infectieux

Concernant l'exposition à domicile, nous avons montré que les patients potentiellement exposés à des fortes proportions d'*A. fumigatus/flavus* par rapport aux moisissures totales avait un risque supérieur de développer une AI. Ainsi, peut être que la mise en place d'une prévention à domicile pourrait diminuer le risque fongique pour ces patients.

Nous ne savons pas au départ si les visites à domicile seraient bien acceptées par ces patients, quelquefois très affaiblis. Mais, lors des visites à domicile, de nombreux patients ont témoigné leur reconnaissance et disaient se sentir suivis même après leur hospitalisation. Les résultats de l'enquête réalisée à leur domicile leur étaient ensuite communiqués ainsi qu'à leur médecin généraliste.

Une contre visite de contrôle n'a eu lieu que dans un seul cas. *F. solani* a été retrouvé dans le prélèvement de surface réalisé dans la salle de bain d'un patient (80 UFC/25cm² de surface). Bien qu'aucun *Fusarium* n'ait été retrouvé dans les prélèvements d'air du logement, des mesures de nettoyage ont été préconisées à la famille du patient. Une visite de contrôle a ensuite été réalisée deux mois après et aucun *Fusarium* n'a été détecté. En revanche, l'analyse en culture des poussières échantillonnées par EDC (représentant l'exposition des deux derniers mois) a mis en évidence la présence de *F. solani*. Nous avons donc bien réexpliqué au patient les mesures de précaution à prendre : nettoyage des surfaces (eau javellisée) et ouverture des fenêtres régulière.

Un autre patient avait à chaque porte dans son logement des épis de blé séchés. Lors de la visite, il a été difficile de convaincre la famille d'enlever ces épis, considérés par celle-ci comme porte bonheur.

DISCUSSION

Les résultats des analyses ont révélés dans la semaine suivante de fortes proportions d'*A. fumigatus* (>50%). La communication des résultats avait alors été effectuée avec l'aide du médecin d'hématologie mais une visite de contrôle n'a pas pu être réalisée (nouvelle hospitalisation du patient, puis décès deux mois après).

Des recommandations générales pour le retour à domicile sont déjà données aux patients lors de leur hospitalisation, mais étant donné le flux d'informations qu'ils doivent intégrer, ils ne peuvent pas toutes les assimiler. Ainsi, certains paraissaient étonnés que la question du nombre de plantes dans leur logement leur soit posée. D'autres continuaient à bricoler dans leur garage ou à jardiner. La visite chez ces patients a ainsi renforcé la nécessité de distribuer un guide de prévention des IFI à domicile avec les précautions à prendre et les comportements à éviter. Un exemplaire de ce livret est disponible en annexe. Il sera bientôt édité et distribué en hématologie. Malgré cela, il reste absolument nécessaire d'aller chez ces patients, notamment pour détecter des situations à risque spécifiques à chaque logement.

Cette étude a permis d'apporter des éléments supplémentaires pour argumenter la mise en place en routine d'une visite à domicile réalisée par les CMEI. Cette visite aura lieu durant l'hospitalisation des patients, afin de s'assurer de la qualité de l'environnement intérieur qui accueillera le patient à son retour. A ce jour, les visites des CMEI ont surtout lieu dans le cas de pathologies allergiques et leur efficacité en termes de réduction des allergènes a déjà été montrée (de Blay et al., 2003).

En cas de contamination détectée chez les patients d'hématologie, elles pourront conseiller des mesures de précaution adaptées à la situation. Un nettoyage pourra être entrepris avant le retour du patient s'il permet une réduction de la contamination. Un relogement temporaire du patient pourra être envisagé dans les cas extrêmes. Enfin, la communication des résultats de l'audit environnemental à l'équipe médicale d'hématologie pourra entraîner, dans certains cas, la prescription d'un traitement prophylactique avant le retour au domicile.

4. Nécessité d'une approche multifactorielle pour les maladies allergiques

Nous avons évoqué l'importance d'une approche multi microorganismes (bactéries, moisissures, acariens) dans l'étude des maladies allergiques et le suivi de grande cohorte d'enfants. Mais cette approche multifactorielle du risque asthmatique devra encore aller plus loin : tout d'abord, au vu de nos résultats et de la cartographie obtenue des logements français, il sera primordial de prendre en compte les facteurs géographiques. De plus, différents facteurs environnementaux, les infections virales, le tabagisme et la pollution environnementale de l'air favoriseraient la pénétration des

allergènes dans les voies respiratoires (Ceylan et al., 2013). L'effet des endotoxines serait aussi modifié par une co-exposition à la nicotine et au dioxyde d'azote (Matsui et al., 2013). L'intégration des analyses des logements EBRA ELFE dans une étude de l'ampleur d'ELFE, avec une vingtaine de groupe de recherche avec des thématiques différentes, permettra sans doute d'avoir une approche complète des différents facteurs mentionnés ci-dessus. L'analyse des données de santé pourra donc être intégrée dans une analyse globale de l'environnement intérieur.

5. Mise en place de nouveaux indicateurs ?

Nous sommes tous exposés quotidiennement aux microorganismes de l'environnement intérieur. Un moyen préventif pour éviter les effets sur la santé est visiblement de réduire l'exposition des patients/personnes à certains microorganismes. En revanche, les outils de mesure et la façon d'interpréter les résultats disponibles jusqu'à présent ne permettent pas de relier les différents risques pour la santé et les contaminations observées.

Pour l'étude sur le risque fongique des patients immunodéprimés au retour à domicile, nous avons proposé une approche qui prenait en compte le pourcentage d'*A. fumigatus/flavus* par rapport aux moisissures totales présentes et non la simple présence ou la quantification de ces espèces uniquement. Un environnement complexe, avec beaucoup d'autres espèces fongiques limite peut-être le développement des *A. fumigatus* et *flavus* par des phénomènes de compétition et serait donc moins à risque pour les patients immunodéprimés.

Pour l'étude ELFE, la présence des quatre entités distinctes impliquées dans les maladies allergiques (*A. alternata*, les autres moisissures, les bactéries et l'acarien), mises en évidence dans l'ACP partielle, confirme l'importance d'une mesure ciblant plusieurs types de microorganismes. Les résultats que nous avons pour le moment ne peuvent pas encore être reliés à des données de santé. Mais nous supposons que notre approche, prenant en compte plusieurs microorganismes et donc leurs interactions potentielles, sera plus adaptée pour appréhender un risque allergique que l'étude de différentes espèces prises séparément. Certains auteurs ont d'ailleurs rapporté qu'une réduction de la diversité des espèces fongiques et bactériennes entraînait un risque accru de développer de l'asthme (Ege et al., 2011; Heederik and von Mutius, 2012).

TIARÉ est la seule étude menée pour laquelle un microorganisme à lui seul, a pu être lié à une pathologie. Les concentrations élevées d'*A. fumigatus*, mesurées par qPCR dans les logements de patients atteints de mucoviscidose, ont en effet pu être reliées aux cas d'ABPA. La sensibilité des

patients à *A. fumigatus* (IgE spécifiques et précipitines) est un critère de diagnostic de l'ABPA. Ainsi, une quantification spécifique d'*A. fumigatus*, témoignant de l'exposition des patients et donc de leur sensibilisation potentielle, pourrait permettre de détecter à elle seule des situations à risque. Les résultats observés seront à confirmer avec un nombre plus important de patients inclus et de logements analysés.

Ainsi, la mesure de l'exposition et surtout l'interprétation des résultats ne semble pas pouvoir être exprimée de la même façon pour les différentes pathologies. Mais peut être que d'appréhender l'exposition en termes d'équilibre entre les différents microorganismes présents, pour certaines pathologies est une voie de réflexion possible.

6. Perspectives

Les techniques de séquençage de nouvelle génération permettent d'ailleurs d'avoir une idée de la diversité des flores bactérienne et fongique présentes (Heederik and von Mutius, 2012). Elles ont été utilisées pour évaluer la composition microbiologique (fongique et bactérienne) de l'environnement intérieur (Dannemiller et al., 2014; Nonnenmann et al., 2012) et sont également utilisés pour étudier le microbiote pulmonaire de patients atteints de mucoviscidose (Delhaes et al., 2012), de patients greffés des poumons (Charlson et al., 2012) ou d'individus sans pathologies particulières (Ghannoum et al., 2010).

Avec les résultats obtenus à partir de ces nouvelles technologies (ceux publiés et nos essais préliminaires présentés en annexe), nous pourrions adapter nos cibles qPCR pour l'étude des logements et mieux cibler les pathologies qui pourraient y être associées. Des travaux ont réussi à relier par exemple les résultats de qPCR *A. fumigatus* obtenus dans des expectorations de patients asthmatiques avec les résultats obtenus dans des prélèvements de poussières au logement des patients (Fairs et al., 2013), ceci renforçant le rôle de l'exposition à domicile.

Dans ce même sens, il faudrait pouvoir relier les souches colonisant les patients (AI et ABPA) avec celles de l'environnement par des méthodes de typage, afin de savoir si les souches rencontrées dans des logements de patients asthmatiques ont les mêmes propriétés et la même virulence que les souches rencontrées chez les patients atteints d'ABPA et d'AI.

Parallèlement, des essais *in vitro* et *in vivo* devraient permettre de mieux identifier les espèces et les mécanismes en cause. La bioluminescence, basée sur la détection de photons produits lors de

DISCUSSION

l'oxydation enzymatique d'un substrat par la luciférase, est utilisée *in vitro* pour étudier l'efficacité d'antifongiques (Brock et al., 2008). Elle permet aussi d'étudier le développement d'AI, la localisation et la charge de moisissures dans les tissus et peut aussi être utilisée pour étudier l'effet des antifongiques sur *A. fumigatus* chez des souris par exemple (Galiger et al., 2013).

D'autre part, des approches utilisant des modèles vertébrés et plus récemment invertébrés comme la drosophile, sont développées afin d'étudier les effets des microorganismes. Récemment, une équipe a comme ceci montré l'effet des COV émis par différentes moisissures sur l'apoptose cellulaire des drosophiles (Inamdar and Bennett, 2013). D'autres travaux, menés sur des souris, ont étudié les effets allergiques que pouvaient entraîner certaines moisissures utilisées dans le calcul de l'ERMI (Ward et al., 2014).

De telles approches, si elles combinaient différents microorganismes, pourraient permettre d'avancer également dans l'établissement de relation dose/effet, tout en prenant en compte de possibles effets synergiques.

ANNEXES

Techniques d'échantillonnage et méthodes d'analyse

1. Prélèvements d'air dans le logement

La chambre, considérée comme la pièce où chaque individu passe une grande partie de son temps et la salle de bain, point humide de l'habitation, ont systématiquement été échantillonnées. Deux pièces additionnelles, choisies en fonction des habitudes et/ou activités du patient au sein de son logement (télévision au salon, bricolage dans un atelier, tri de papiers au bureau...) ont également été prospectées.

A chaque point de prélèvement, 250L d'air ont été échantillonnés à l'aide d'un impacteur MAS 100™ Merck®, Darmstadt, Germany, (Figure 19) à un débit de 100L/minute. L'air passe par une grille de 90mm de diamètre percée de 400 trous et est directement impacté sur une gélose. Le milieu utilisé était le milieu DG18, couramment utilisé pour la détection des espèces environnementales, et mis en culture à 30°C.



Figure 19 : MAS 100™ (Merck®, Darmstadt, Germany)

2. Prélèvements de surface

Pour les logements de l'étude FIQCS, la surface écouvillonnée était de 25cm² suivant différentes directions : de haut en bas, de gauche à droite et obliquement afin de favoriser la collecte d'un maximum de spores.

Lorsque le logement présentait des surfaces moisies, l'écouvillonnage y était privilégié. Dans le cas inverse, le prélèvement était réalisé sur un mur adjacent à une fenêtre. Les organismes collectés ont été récupérés dans 1 mL de liquide de rinçage, Tween 80 (Merck®, Schuchardt, Germany) à 0,1% en eau physiologique stérile (vortexé pendant une minute). Cent microlitres de cette solution ont été ensemencées sur milieu DG18 (placé à 30°C).

3. Prélèvements de poussière

Nous nous sommes appuyés sur les EDC décrits dans la littérature (Noss et al., 2008), formés par des pochettes plastiques munies de 4 lingettes électrostatiques, pour améliorer le dispositif jugé trop encombrant. Ainsi, des boîtiers de type DVD munis de lingette stérile électrostatique non imprégnée, de 18cm x 26cm, ont permis de collecter la poussière durant deux mois (Figure 20). Ils étaient placés ouverts, en hauteur, sur une armoire de la chambre.



Figure 20 : Capteur électrostatique de poussière (EDC)

De la même façon que pour les écouvillons, les échantillons ont été récupérés à l'aide d'un liquide de rinçage selon un protocole bien défini. La lingette a été froissée et placée dans un sac stérile où ont été ajoutés 20mL de Tween 80 (Merck®, Schuchardt, Germany) à 0,1% en eau physiologique stérile. Le tout a été brassé 10 minutes dans un Stomacher™ (AES®, Combourg, France). Le liquide de rinçage a été ensuite récupéré par essorage manuel : trois fortes pressions de la lingette contre la paroi du sac, de haut en bas. Ainsi, 10 millilitres (+/- 0,5 mL) ont été récupérés pour chaque lingette. Cent microlitres ont étéensemencés sur les milieux de culture DG18 (incubé à 30°C) et Malt (incubé à 20°C).

4. Autres prélèvements

Cinq grammes de chacun des fourrages ont été rincés dans 80mL de solution de Tween 80 à 0.1% (Vacheyrou et al., 2011), 2 grammes des différents types de sols (Snelders et al., 2009) et la totalité des poussières des filtres du tracteur ont été resuspendus dans 10mL de la solution de Tween. Cent microlitres de chacune de ces solutions de rinçage ont ensuite étéensemencés sur DG18 et milieu Malt Itraconazole et incubés à 30°C, 37°C et 48° C.

Analyse par culture

L'identification des moisissures s'est faite à J2, J3 et J5 pour les températures de 30°C, 38°C et 48°C

respectivement, selon les caractères macroscopiques et microscopiques des ouvrages de référence (Chabasse et al., 2002; Chabasse et al., 2008). Les résultats ont été exprimés en UFC / unité de prélèvement.

Ainsi, afin d'obtenir le nombre de colonies formées par m³ d'air, le nombre de colonies (n) obtenu en culture a été multiplié par 4 puis par un facteur de 1,3 (calculé d'après des comparaisons de résultats de 8 prélèvements de 100 et de 250L). Pour les 25cm² écouvillonnés, le résultat a été multiplié par 10 (dilution dans 1mL et colonies comptées pour 100μL)

Pour ramener les résultats obtenus à une surface de 25cm², le calcul suivant a été appliqué (avec 18x26 pour la taille des lingettes): $[(n \times 100) / (18 \times 26)] \times 25$

Analyse par PCR quantitative en temps réel

L'extraction d'ADN des liquides de rinçage des EDC (Keswani et al., 2005) a été réalisée dans des tubes Roche contenant des billes de céramique (MagNA Lyser Green Beads) dans lesquels ont été ajoutés 198 μL de cœur cerveau sans chloram phénicol et 2 μL de *G. candidum*. L'extraction comprend deux étapes de lyse: une lyse mécanique à l'aide d'un vibrobroyeur Magna Lyser Roche (trois cycles composés de 10 secondes à 4500 rpm séparés par une minute dans un bloc réfrigérant) et une lyse thermique (10 minutes dans l'eau bouillante et 10 minutes dans la glace). Pour finir, une étape de centrifugation a été réalisée (deux minutes à 4°C à 10 000 rpm) pour récupérer un surnageant de 200μL.

Les réactions de qPCR ont été réalisées dans un volume final de 20μL comprenant 10μL de Master Mix (Brilliant III Ultra-fast qPCR Master Mix, Agilent technologies®, Massy, France), 4μL du mélange d'amorces (à 5pM chacune), 0,8μL de sondes (à 5pM), 0,2μL de dye et 5μL d'échantillon. L'analyse a été effectuée à l'aide d'un Automate Applied Biosystem 7500 Fast, sur des plaques de 96 puits avec le programme suivant : 3 minutes à 95°C, puis 45 cycles composés de 15 secondes à 95°C et une minute à 60°C.

Les différentes techniques de prélèvements et d'analyses pour les différentes études sont synthétisées dans le tableau ci-dessous.

ANNEXES

Tableau 13 : Types de prélèvement suivant les études menées

Etudes	AIR (MASS100) analysé par culture	SOLS FOURAGES analysés par culture	EAU	SURFACES (Ecouillons) analysées par culture et qPCR	POUSSIERES (EDC) analysées par culture et/ou qPCR
FIQCS	x			x	x (culture et qPCR)
Cas M. X	x	x		x	x (culture et qPCR)
Cabinets médicaux	x		x	x	
Pilote EBRA-ELFE					x (qPCR)
EBRA-ELFE					x (qPCR)
TIARE					x (culture et qPCR)

Cibles qPCR utilisées et sources

Absidia corymbifera (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens NS92F: 5'-CACCGCCCGTCGCTAC-3'

Amorce antisens AcoryR1: 5'-GCAAAGCGTCCGAAGGACA-3'

Sonde AcoryP1: 5'-ATGGCACGAGCAAGCATTAGGGACG-3'

Alternaria alternata (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens AaltrF1: 5'-GGCGGGCTGGAACCTC-3'

Amorce antisens AltrR1-1: 5'-GCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTGTA-3'

Sonde AaltrP1: 5'-TTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTT- 3'

Aspergillus fumigatus (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens AfumiF1: 5'-GCCCGCCGTTTCGAC-3'

Amorce antisens AfumiR1: 5'-CCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTAC-3'

Sonde AfumiP1: 5'- CCCGCCGAAGACCCCAACATG-3'

Aspergillus versicolor (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens AversF2 (5×): 5'-CGGCGGGGAGCCCT-3'

Amorce antisens AversR1-1: 5'-CCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATcTTA-3'

Sonde versP1: 5'-AGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAG- 3'

Cladosporium sphaerospermum (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens CsphaF1: 5'-ACCGGCTGGGTCTTTCG-3'

Amorce antisens primer CsphaR1: 5'-GGGGTTGTTTTACGGCGTG-3'

Sonde CsphaP1: 5'- CCCGCGGCACCCTTTAGCGA-3'

Dermatophagoïdes pteronissynus (Roussel et al., 2013)

Amorce sens Dpter F1: 5'-TGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTG-3'

Amorce antisens DpterR1: 5'-ATGCGATAATCTGCTCAGTATGACA-3'

Sonde DpterP1: 5'-CAGCTCATGTATGGCGGTCCACCTG-3'

Enterobacteriaceae (*Serratia* sp., *Enterobacter* sp. and *Klebsiella* sp.) (Sen and Asher, 2001)

Amorce sens UF2: 5'-GGCGGCAGGCCTAAC-3'

Amorce antisens UR2: 5'-CAGGCAGTTTCCAGACATTACT-3'

Sonde 5'-AGCAAGCTCTCTGTGCTACCGCTCGA-3'

Exophiala dermatitidis (Roussel, en rédaction)

Amorce sens EXO1 : 5'-GGCGGCCTGGTTGGA-3'

Amorce antisens EXO2: 5'-GGACACCTTGAAACCGATACG-3'

Sonde _Pr1 : 5'-CCCCGGTACACGGAGCTTCTTCACTG-3'

Fusarium solani f.sp. *batatas* MP II (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens FsolaF2: 5'-CGCCGCAGCTTCCAAT-3'

Amorce antisens FsolaR2: 5'-GATTCGAGGTCAACGTTCTAAAAGT-3'

Sonde FsolaP1mgb: 5'-CGTAGTAGCTAACACCTC-3'

Fusarium solani f.sp. *cucurbitae* MP I (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens FsolaF1: 5'-CAGCCGCAGCTTCCAGT-3'

Amorce antisens FsolaR1-1: 5'-CGTGGCCGAGCCTCTG-3'

Sonde FsolaP1mgb: 5'-CGTAGTAGCTAACACCTC-3'

Fusarium solani f.sp. *mori* MP III, *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* MP V, *Fusarium solani* f.sp. *pisi* MP VI, *Fusarium solani* f.sp. *robiniae* MP VII (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens FsolaF3: 5'-CGCCGCAGCTTCCATC-3'

Amorce antisens FsolaR3: 5'-GATTCGAGGTCAACTTCAGAAGAG-3'

Sonde FsolaP1mgb: 5'-CGTAGTAGCTAACACCTC-3'

Fusarium solani f.sp. *xanthoxyli* MP IV (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens FsolaF4: 5'-CGCCGCAGCTTCCATT-3'

Amorce antisens FsolaR4-1: 5'-GATTCGAGGTCAACTTTCAGAtGT-3'

Sonde FsolaP1mgb: 5'-CGTAGTAGCTAACACCTC-3'

Mucor racemosus (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens NS92F: 5'-CACCGCCCGTCGCTAC-3'

Amorce antisens MucR1-1: 5'-CCTAGTTTGCCATAGTTCTCAGCAG-3'

Sonde MucP1: 5'-CCGATTGAATGGTTATAGTGAGCA-3'

Mycobacteria (Torvinen et al., 2006)

Amorce sens Mf939: 5'-GATGCAACGCGAAGAACCTT-3'

Amorce antisens Mr1011: 5'-TGCACCACCTGCACACAGG-3'

Sonde Mp960: 5'-CCTGGGTTTGACATGCACAGGACG-3'

Penicillium chrysogenum (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens PchryF4-1: 5'-GCCTGTCCGAGCGTCACTT-3'

Amorce antisens PchryR8: 5'-CCCCCGGGATCGGAG-3'

Sonde PenP6: 5'-CCAACACACAAGCCGTGCTTGAGG-3'

Rhizomucor meihei/pusillus/variabilis (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens NS92F: 5'-CACCGCCCGTCGCTAC-3'

Amorce antisens RmucR1: 5'-GTAGTTTGCCATAGTTCGGCTA-3'

Sonde RmucP1: 5'-TTGAATGGCTATAGTGAGCATATGGGAGGCT-3'

Rhizopus stolonifer (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens NS92F: 5'-CACCGCCCGTCGCTAC-3'

Amorce antisens RstolR1: 5'-GCTTAGTTTGCCATAGTTCTTAACAA-3'

Sonde MucP1: 5'-CCGATTGAATGGTTATAGTGAGCATATGGGATC-3'

Stachybotrys chartarum (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens StacF4: 5'-TCCCAAACCCTTATGTGAACC-3'

Amorce antisens StacR5: 5'-GTTTGCCACTCAGAGAATACTGAAA-3'

Sonde StacP2: 5'-FAM-CTGCGCCCGGATCCAGGC-TAMRA-3'

Streptomyces (Rintala and Nevalainen, 2006)

Amorce sens SMfw8: 5'-GCCGATTGTGGTGAAGTGGA-3'

Amorce antisens Mrev9: 5'-GTACGGGCCGCCATGAAA-3'

Sonde: SMP6 5'-ATCCTATGCTGTCGAGAAAAGCCTCTAGCG-3'

Essais d'analyse par métagénomique

Des essais préliminaires pour tester la performance du séquenceur de nouvelle génération Ion Torrent (Life Technologies) ont été réalisés (puce 314, kit 400 pb). Des PCR universelles ITS (couplées à un tag et à un adaptateur pour le séquençage) ont été réalisées sur différents échantillons (extraction ADN en kit) et le séquençage d'amplicons a ensuite été effectué.

Des mélanges artificiels de moisissures ont été réalisés avec dix espèces de moisissures : *C. cladosporoides*, *P. chrysogenum*, *S. chartarum*, *A. alternata*, *M. racemosus*, *A. corymbifera*, *A. fumigatus*, *F. solani*, *Wallemia sebi*, *Eurotium amstelodami*.

Un mélange équimolaire était composé de 5µL de chaque espèce concentrée à 5000 fg d'ADN/µL.

Un mélange non équimolaire a également été réalisé avec :

- *C. cladosporoides*, *P. chrysogenum*, *S. chartarum* à 50 fg/µL

- *A. alternata*, *M. racemosus*, *A. corymbifera* à 500 fg/µL

- *A. fumigatus*, *F. solani*, *Wallemia sebi*, *Eurotium amstelodami* à 5000 fg/µL.

Les dix espèces ont également été amplifiées individuellement par PCR puis poolées après la réaction pour le séquençage (voir s'il y avait un biais de PCR ?). Deux lingettes provenant d'EDC et 4 prélèvements de poussières obtenus par aspiration ont été rajouté au pool d'échantillons.

La comparaison des séquençages des 10 espèces amplifiées ensemble ou séparément a montré que certains champignons semblaient être amplifiés de façon préférentielle. La PCR pose visiblement des problèmes chez ceux qui avaient les plus forts taux de GC (55% pour *A. fumigatus*) ou des tailles de séquences importantes. Après séquençage et traitement des données (Benoit Vallot), les 8 premiers OTU retrouvés dans le mélange équimolaire correspondaient à 8 des 10 espèces qui composaient ce mélange, *A. fumigatus* (55% de GC) et *A. corymbifera* (fragment de 386 pb) n'ayant pas été retrouvés.

Cladosporium, *Galactomyces*, *Cryptococcus* (Tremellales), *Epicoccum*, *Wallemia*, *Cryptococcus* (Filobasidiales), *Alternaria* et *Geotrichum* sont les OTU les plus retrouvés dans les prélèvements de domiciles. Sur ces premiers essais, des différences semblent apparaître en fonction du type de prélèvement : *Alternaria*, plus spécifique des prélèvements par EDC et *Cryptococcus*, des poussières aspirées. En revanche, le genre *Penicillium* a été retrouvé uniquement dans 1% des séquences.

Dépliant (en 3 volets) des recommandations pour les patients d'hématologie

UNITES HOSPITALIERES	<h3>PREVENTION MISE EN PLACE</h3> <p>Les patients hospitalisés pour une greffe de moelle passent souvent plusieurs semaines dans une chambre à flux laminaire où l'air y est filtré. Les visites sont limitées, les chambres sont bionettoyées et tout ce qui rentre dans la chambre (matériel, repas) est stérilisé ou décontaminé.</p> <p>Au CHRU de Besançon, des prélèvements hebdomadaires d'air et de surfaces sont réalisés dans le service d'hématologie pour vérifier l'absence d'espèces opportunistes.</p> 	<h3>QUELQUES CHIFFRES</h3> <p>10 % de logements sont concernés par des problèmes de moisissure (avec plus de 1000 spores de moisissures par m³ d'air et d'humidité (>50% d'humidité)).</p> <p>Une famille de 4 personnes produit 25 à 35l de vapeur d'eau par semaine:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Activité domestiques (douche, cuisson, lessive) = 15 à 20l - Séchage linge à l'intérieur = 10 à 15l 	
A DOMICILE	<p>Depuis 2014, des dispositions sont prises au CHU de Besançon pour réaliser un diagnostic environnemental au domicile des patients hospitalisés en hématologie.</p> <p>Une visite à domicile de 30 minutes est réalisée par une Conseillère Médicale en Environnement Intérieur (CMEI) pendant l'hospitalisation du patient. Des prélèvements de surface et d'air sont réalisés dans le logement et un capteur électrostatique de poussière est déposé dans la chambre. Ce capteur reste en place 2 mois et est ensuite renvoyé par la poste au laboratoire d'analyse.</p> <p>L'analyse des échantillons et l'observation de la CMEI permettront de faire un diagnostic du logement et de conseiller les patients pour assainir le logement.</p> <p>CONTACTER LE RAFT POUR UN RDV</p>	<h3>CONTACTS</h3> <p>Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Pr L. MILLON Dr G. REBOUX Dr AP. BELLANGER 03.81.66.91.65</p> <p>Réseau d'Allergologie de Franche-comté (RAFT) pour visite CMEI JM. RAME (responsable) raft@chu-besancon.fr</p> <p>Service d'Hématologie Clinique Pr E. DECONINK Pôle GERIS Dr X. BERTRAND Département de Médecine Générale Dr F. DUMEL</p> <p>Réalisation S. ROCCHI</p>	 <h3>La prévention du risque fongique au retour à domicile</h3>  <p>Action coordonnée des services hospitaliers d'Hématologie Clinique et de Parasitologie-Mycologie avec les médecins généralistes de ville</p>

LA PREVENTION DU RISQUE FONGIQUE AU RETOUR A DOMICILE			
GENERALITES	<h3>LES MOISSURES</h3> <p>Les moisissures, naturellement présentes dans le milieu intérieur, regroupent les champignons filamenteux et les levures.</p> <p>Elles sont capables de se développer tous les types de milieux (plâtre, bois, papier, fruits...)</p>  <h3>INHALATION</h3> <p>Les champignons se multiplient par des spores qui assurent leur propagation. De petite taille (2 millièmes de millimètre), elles sont facilement véhiculées par l'air et sont donc facilement inhalées.</p>  <p>Certaines espèces dites "opportunistes" peuvent avoir des effets néfastes sur la santé. Elles peuvent notamment entraîner des infections, comme l'Aspergillose invasive, chez des personnes aux défenses immunitaires amoindries.</p>	<h3>ESPECES IMPLIQUEES</h3> <p>Les espèces impliquées sont celles qui sont capables de se développer à 37°C.</p> <p>Leurs noms : <i>Aspergillus fumigatus</i>, <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Fusarium</i>, <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i>, <i>Rhizopus</i> et <i>Scedosporium</i>.</p>  <p><i>Aspergillus fumigatus</i> sur milieu de culture au microscope</p> <p>Des aspergilloses surviennent quelquefois plusieurs semaines voir plusieurs mois après le traitement, alors que le patient est rentré à domicile. Le genre <i>Aspergillus</i> est l'un des 3 genres de moisissures les plus retrouvés dans les logements.</p> <p>Les mesures de prévention au domicile sont donc indispensables.</p>	<h3>MODIFICATION COMPORTEMENT</h3> <ul style="list-style-type: none"> □ Eviter les pièces comportant des taches de moisissures ou ayant une odeur de mois (cave, grenier par exemple) □ Faire nettoyer régulièrement le logement, par un tiers. Nettoyer à l'eau de javel à 10% (pas de dépolluérage à sec) et aspirer (filtre HEPA). <h3>Minimiser l'humidité</h3>  <p>AERER Toutes les pièces 10 min/jour minimum</p> <p>VENTILER le logement</p> <ul style="list-style-type: none"> □ Aérer d'avantage après toute activité produisant de l'humidité (bain, douche, cuisine) □ Couvrir les casseroles pendant la cuisine □ Etendre le linge dehors ou dans une pièce ventilée et aérée
PREVENTION AU DOMICILE	<h3>RECOMANDATIONS GENERALES</h3>  <p>HUMIDITE TERRE POUSSIERE</p> <p>Trajets</p> <ul style="list-style-type: none"> □ Nettoyer la voiture et éviter l'air climatisé □ Porter un masque pendant les trajets 	<h3>PREVENTION AU DOMICILE</h3> <h3>Eviter la poussière</h3> <ul style="list-style-type: none"> □ Eliminer les tapis □ Enlever les plantes en pots, fleurs séchées, éléments de décor source de poussière. □ Eviter la manipulation d'épices moulues (poivre), thés et tisanes □ Fermer les fenêtres lors de travaux de jardinage à proximité du logement □ Eviter le bricolage mettant en suspension des matières végétales (travail du bois, du placo-plâtre) ainsi que le jardinage 	

De gauche à droite et de haut en bas : page intérieure, dos, face, 3 pages intérieures.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- Adhikari, A., E. M. Kettleleson, S. Vesper, S. Kumar, D. L. Popham, C. Schaffer, R. Indugula, K. Chatterjee, K. K. Allam, S. A. Grinshpun, and T. Reponen, 2014, Dustborne and airborne Gram-positive and Gram-negative bacteria in high versus low ERMI homes: *Sci Total Environ*, v. 482-483, p. 92-9.
- Agarwal, R., and D. Gupta, 2010, Severe asthma and fungi: current evidence: *Medical Mycology*, v. 49, p. S150-S157.
- Ahmad, S., Z. Khan, F. Hagen, and J. F. Meis, 2014, Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait: *Environ Res*, v. 133C, p. 20-26.
- Akan, H., V. P. Antia, M. Kouba, J. Sinko, A. D. Tanase, R. Vrhovac, and R. Herbrecht, 2013, Preventing invasive fungal disease in patients with haematological malignancies and the recipients of haematopoietic stem cell transplantation: practical aspects: *J Antimicrob Chemother*, v. 68 Suppl 3, p. iii5-16.
- Alanio, A., E. Sitterle, M. Liance, C. Farrugia, F. Foulet, F. Botterel, Y. Hicheri, C. Cordonnier, J. M. Costa, and S. Bretagne, 2011, Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies: *J Antimicrob Chemother*, v. 66, p. 371-4.
- Alberti, C., A. Bouakline, P. Ribaud, C. Lacroix, P. Rousselot, T. Leblanc, and F. Derouin, 2001, Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients: *Journal of Hospital Infection*, v. 48, p. 198-206.
- Andersen, B., J. C. Frisvad, I. Søndergaard, I. S. Rasmussen, and L. S. Larsen, 2011, Associations between fungal species and water-damaged building materials: *Appl Environ Microbiol*, v. 77, p. 4180-8.
- Araujo-Martins, J., P. Carreiro Martins, J. Viegas, D. Aelenei, M. M. Cano, J. P. Teixeira, P. Paixao, A. L. Papoila, P. Leiria-Pinto, C. Pedro, J. Rosado-Pinto, I. Annesi-Maesano, and N. Neuparth, 2014, Environment and Health in Children Day Care Centres (ENVIRH) - Study rationale and protocol: *Rev Port Pneumol*.
- Arnou, P. M., M. Sadigh, C. Costas, D. Weil, and R. Chudy, 1991, Endemic and epidemic aspergillosis associated with in-hospital replication of *Aspergillus* organisms: *J Infect Dis*, v. 164, p. 998-1002.
- Arshad, S. H., S. M. Tariq, S. Matthews, and E. Hakim, 2001, Sensitization to Common Allergens and Its Association With Allergic Disorders at Age 4 Years: A Whole Population Birth Cohort Study: *Pediatrics*, v. 108, p. e33-e33.
- Badali, H., A. Vaezi, I. Haghani, S. A. Yazdanparast, M. T. Hedayati, B. Mousavi, S. Ansari, F. Hagen, J. F. Meis, and A. Chowdhary, 2013, Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran: *Mycoses*, v. 56, p. 659-63.
- Bayry, J., V. Aimanianda, J. I. Guijarro, M. Sunde, and J. P. Latgé, 2012, Hydrophobins--unique fungal proteins: *PLoS Pathog*, v. 8, p. e1002700.
- Becker, R. A., and A. R. Wilks, 2013, mapdata: Extra Map Databases, R package version 2.2-2.
- Bessot, J. C., and G. Pauli, 2011, House dust mites and their allergens, *Rev Mal Respir*, v. 28, p. 227-39.
- Bisgaard, H., M. N. Hermansen, K. Bonnelykke, J. Stokholm, F. Baty, N. L. Skytt, J. Aniscenko, T. Kebabdz, and S. L. Johnston, 2010, Association of bacteria and viruses with wheezy episodes in young children: prospective birth cohort study: *Bmj*, v. 341, p. c4978.
- Borcard, D., F. Gillet, and P. Legendre, 2011, Numerical ecology with R.
- Bornehag, C. G., J. Sundell, S. Bonini, A. Custovic, P. Malmberg, S. Skerfving, T. Sigsgaard, A. Verhoeff, and EUROEXPO, 2004, Dampness in buildings as a risk factor for health effects, EUROEXPO: a multidisciplinary review of the literature (1998-2000) on dampness and mite exposure in buildings and health effects: *Indoor Air*, v. 14, p. 243-57.
- Bousquet, J., J. Anto, J. Sunyer, M. Nieuwenhuijsen, M. Vrijheid, and T. Keil, 2013, Pooling birth cohorts in allergy and asthma: European Union-funded initiatives - a MedALL, CHICOS, ENRIECO, and GA(2)LEN joint paper: *Int Arch Allergy Immunol*, v. 161, p. 1-10.

RÉFÉRENCES

- Bousquet, P. J., R. Hooper, M. Kogevinas, D. Jarvis, and P. Burney, 2007, Number of allergens to be tested to assess allergenic sensitization in epidemiologic studies: results of the European Community Respiratory Health Survey I: Clin Exp Allergy, v. 37, p. 780-7.
- Boutin-Forzano, S., C. Charpin-Kadouch, M. Gouitaa, H. Dumon, and D. Charpin, 2006, Audit environnemental des logements : intérêt d'identifier la ou les moisissure(s) en cause: Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, v. 46, p. 197-203.
- Bouza, E., T. Peláez, J. Pérez-Molina, M. Marín, L. Alcalá, B. Padilla, and P. Muñoz, 2002, Demolition of a hospital building by controlled explosion: the impact on filamentous fungal load in internal and external air: Journal of Hospital Infection, v. 52, p. 234-242.
- Brenier-Pinchart, M. P., B. Lebeau, J. L. Quesada, M. R. Mallaret, J. L. Borel, A. Mollard, F. Garban, J. P. Brion, L. Molina, J. L. Bosson, J. Y. Cahn, R. Grillot, and H. Pelloux, 2009, Influence of internal and outdoor factors on filamentous fungal flora in hematology wards: Am J Infect Control, v. 37, p. 631-7.
- Brock, M., G. Jouvion, S. Droin-Bergere, O. Dussurget, M. A. Nicola, and O. Ibrahim-Granet, 2008, Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a new tool for drug efficiency testing and in vivo monitoring of invasive aspergillosis: Appl Environ Microbiol, v. 74, p. 7023-35.
- Brown, G. D., D. W. Denning, N. A. Gow, S. M. Levitz, M. G. Netea, and T. C. White, 2012, Hidden killers: human fungal infections: Sci Transl Med, v. 4, p. 165rv13.
- Bueid, A., S. J. Howard, C. B. Moore, M. D. Richardson, E. Harrison, P. Bowyer, and D. W. Denning, 2010, Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009: J Antimicrob Chemother, v. 65, p. 2116-8.
- Bundy, K. W., J. F. Gent, W. Beckett, M. B. Bracken, K. Belanger, E. Triche, and B. P. Leaderer, 2009, Household airborne *Penicillium* associated with peak expiratory flow variability in asthmatic children: Annals of Allergy, Asthma & Immunology, v. 103, p. 26-30.
- Burgel, P. R., M. T. Baixench, M. Amsellem, E. Audureau, J. Chapron, R. Kanaan, I. Honore, J. Dupouy-Camet, D. Dusser, C. H. Klaassen, J. F. Meis, D. Hubert, and A. Paugam, 2012, High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole: Antimicrob Agents Chemother, v. 56, p. 869-74.
- Bush, R. K., J. M. Portnoy, A. Saxon, A. I. Terr, and R. A. Wood, 2006, The medical effects of mold exposure: Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 117, p. 326-333.
- Bénet, T., M.-C. Nicolle, A. Thiebaut, M.-A. Piens, F.-E. Nicolini, X. Thomas, S. Picot, M. Michallet, and P. Vanhems, 2007, Reduction of Invasive Aspergillosis Incidence among Immunocompromised Patients after Control of Environmental Exposure: Clinical Infectious Diseases, v. 45, p. 682-686.
- Casas, L., C. Tiesler, E. Thiering, I. Brüske, S. Koletzko, C. P. Bauer, H. E. Wichmann, A. von Berg, D. Berdel, U. Krämer, B. Schaaf, I. Lehmann, O. Herbarth, J. Sunyer, J. Heinrich, and G. a. L. S. Group, 2013a, Indoor factors and behavioural problems in children: the GINIplus and LISAPlus birth cohort studies: Int J Hyg Environ Health, v. 216, p. 146-54.
- Casas, L., M. Torrent, J. P. Zock, G. Doekes, J. Forns, M. Guxens, M. Taubel, J. Heinrich, and J. Sunyer, 2013b, Early life exposures to home dampness, pet ownership and farm animal contact and neuropsychological development in 4 year old children: A prospective birth cohort study: Int J Hyg Environ Health.
- Ceylan, E., S. Doruk, S. Genc, A. A. Ozkutuk, F. Karadag, G. Ergor, B. O. Itil, and A. H. Cimrin, 2013, The role of molds in the relation between indoor environment and atopy in asthma patients: J Res Med Sci, v. 18, p. 1067-73.
- Chabasse, D., J.-P. Bouchara, and L. Gentile, 2002, Les moisissures d'intérêt médical: Paris, Bioforma.
- Chabasse, D., N. Contet-Andonneau, J.-P. Bouchara, and A.-M. Basile, 2008, Moisissures, dermatophytes, levures du prélèvement au diagnostic: Marcy- l'Etoile (Rhône), Biomérieux, 1 vol. (190 p.) p.
- Chamilos, G., M. Luna, R. E. Lewis, G. P. Bodey, R. Chemaly, J. J. Tarrand, A. Safdar, Raad, and D. P. Kontoyiannis, 2006, Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a

RÉFÉRENCES

- tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003): *Haematologica*, v. 91, p. 986-989.
- Charlson, E. S., J. M. Diamond, K. Bittinger, A. S. Fitzgerald, A. Yadav, A. R. Haas, F. D. Bushman, and R. G. Collman, 2012, Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 186, p. 536-45.
- Charpin, D., P. Parola, I. Arezki, C. Charpin-Kadouch, A. Palot, and H. Dumon, 2010, House-dust mites on wall surfaces of damp dwellings belong to storage mite genus: *Allergy*, v. 65, p. 274-275.
- Chowdhary, A., S. Kathuria, H. S. Randhawa, S. N. Gaur, C. H. Klaassen, and J. F. Meis, 2012a, Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the cyp51A gene in India: *J Antimicrob Chemother*, v. 67, p. 362-6.
- Chowdhary, A., S. Kathuria, J. Xu, C. Sharma, G. Sundar, P. K. Singh, S. N. Gaur, F. Hagen, C. H. Klaassen, and J. F. Meis, 2012b, Clonal Expansion and Emergence of Environmental Multiple-Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains Carrying the TR34/L98H Mutations in the cyp51A Gene in India: *PloS one*, v. 7, p. e52871.
- Colloff, M. J., 2009, Dust mites.
- Consensus Conference, 2001, Preventing the risk of *Aspergillus* infection in immunocompromised patients, *Bull Cancer*, p. 589-600.
- Cornet, M., L. Fleury, C. Maslo, J. F. Bernard, and G. Brückner, 2002, Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area: *Journal of Hospital Infection*, v. 51, p. 288-296.
- Dannemiller, K. C., M. J. Mendell, J. M. Macher, K. Kumagai, A. Bradman, N. Holland, K. Harley, B. Eskenazi, and J. Peccia, 2014, Next-generation DNA sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development: *Indoor Air*, v. 24, p. 236-47.
- de Blay, F., G. Fourgaut, G. Hedelin, D. Vervloet, F. B. Michel, P. Godard, D. Charpin, and G. Pauli, 2003, Medical Indoor Environment Counselor (MIEC): role in compliance with advice on mite allergen avoidance and on mite allergen exposure: *Allergy*, v. 58, p. 27-33.
- Delhaes, L., S. Monchy, E. Frealle, C. Hubans, J. Salleron, S. Leroy, A. Prevotat, F. Wallet, B. Wallaert, E. Dei-Cas, T. Sime-Ngando, M. Chabe, and E. Viscogliosi, 2012, The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management: *PLoS One*, v. 7, p. e36313.
- Delmas, M. C., N. Guignon, B. Leynaert, I. Annesi-Maesano, L. Com-Ruelle, L. Gonzalez, and C. Fuhrman, 2012, Prévalence et contrôle de l'asthme chez le jeune enfant en France: *Revue des Maladies Respiratoires*, v. 29, p. 688-696.
- Delmas, M. C., N. Guignon, B. Leynaert, L. Com-Ruelle, I. Annesi-Maesano, J. B. Herbert, and C. Fuhrman, 2009, Prévalence de l'asthme chez l'enfant en France: *Archives de Pédiatrie*, v. 16, p. 1261-1269.
- Denning, D. W., and P. Bowyer, 2013, Voriconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Should We Be Concerned?: *Clinical Infectious Diseases*, v. 57, p. 521-523.
- Denning, D. W., S. Park, C. Lass-Flörl, M. G. Fraczek, M. Kirwan, R. Gore, J. Smith, A. Bueid, C. B. Moore, P. Bowyer, and D. S. Perlin, 2011, High-frequency triazole resistance found In nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease: *Clin Infect Dis*, v. 52, p. 1123-9.
- Denning, D. W., C. Pashley, D. Hartl, A. Wardlaw, C. Godet, S. Del Giacco, L. Delhaes, and S. Sergejeva, 2014, Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs: *Clin Transl Allergy*, v. 4, p. 14.
- Denning, D. W., A. Pleuvry, and D. C. Cole, 2013, Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults: *Med Mycol*, v. 51, p. 361-70.
- Douwes, J., P. Thorne, N. Pearce, and D. Heederik, 2003, Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects: *Annals of Occupational Hygiene*, v. 47, p. 187-200.

RÉFÉRENCES

- Ege, M. J., M. Mayer, A. C. Normand, J. Genuneit, W. O. Cookson, C. Braun-Fahrländer, D. Heederik, R. Piarroux, E. von Mutius, and G. T. S. Group, 2011, Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma: *N Engl J Med*, v. 364, p. 701-9.
- Eggleston, P. A., 2007, The environment and asthma in us inner cities*: *CHEST Journal*, v. 132, p. 782S-788S.
- Eisenberger, N. I., E. T. Berkman, T. K. Inagaki, L. T. Rameson, N. M. Mashal, and M. R. Irwin, 2010, Inflammation-induced anhedonia: endotoxin reduces ventral striatum responses to reward: *Biol Psychiatry*, v. 68, p. 748-54.
- Embil, J., P. Warren, M. Yakus, R. Stark, S. Corne, D. Forrest, and E. Hershfield, 1997, Pulmonary illness associated with exposure to *Mycobacterium avium* complex in hot tub water. Hypersensitivity pneumonitis or infection?: *Chest*, v. 111, p. 813-6.
- European Centre for Disease prevention and Control, 2013, Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species., Stockholm, Sweden: ECDC.
- Fairs, A., J. Agbetile, M. Bourne, B. Hargadon, W. R. Monteiro, J. P. Morley, R. E. Edwards, A. J. Wardlaw, and C. H. Pashley, 2013, Isolation of *Aspergillus fumigatus* from sputum is associated with elevated airborne levels in homes of patients with asthma: *Indoor Air*, v. 23, p. 275-84.
- Fisk, W. J., Q. Lei-Gomez, and M. J. Mendell, 2007, Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes: *Indoor Air*, v. 17, p. 284-96.
- Fittipaldi, M., F. Codony, B. Adrados, A. K. Camper, and J. Morato, 2011, Viable real-time PCR in environmental samples: can all data be interpreted directly?: *Microb Ecol*, v. 61, p. 7-12.
- Fournieret-Vivier, A., B. Lebeau, M. R. Mallaret, M. P. Brenier-Pinchart, J. P. Brion, C. Pinel, F. Garban, C. Pison, R. Hamidfar, D. Plantaz, H. Pelloux, and R. Grillot, 2006, Hospital-wide prospective mandatory surveillance of invasive aspergillosis in a French teaching hospital (2000–2002): *Journal of Hospital Infection*, v. 62, p. 22-28.
- Frankel, M., M. Timm, E. W. Hansen, and A. M. Madsen, 2012, Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure: *Indoor air*.
- Fuertes, E., E. MacIntyre, R. Agius, R. Beelen, B. Brunekreef, S. Bucci, G. Cesaroni, M. Cirach, J. Cyrus, F. Forastiere, U. Gehring, O. Gruzdeva, B. Hoffmann, A. Jedynska, M. Keuken, C. Klumper, I. Kooter, M. Korek, U. Kramer, A. Molter, M. Nieuwenhuijsen, G. Pershagen, D. Porta, D. S. Postma, A. Simpson, H. A. Smit, D. Sugiri, J. Sunyer, M. Wang, and J. Heinrich, 2014, Associations between particulate matter elements and early-life pneumonia in seven birth cohorts: Results from the ESCAPE and TRANSPHORM projects: *Int J Hyg Environ Health*.
- Galiger, C., M. Brock, G. Jouvion, A. Savers, M. Parlato, and O. Ibrahim-Granet, 2013, Assessment of efficacy of antifungals against *Aspergillus fumigatus*: value of real-time bioluminescence imaging: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, p. 3046-59.
- Garrett, Rayment, Hooper, and Abramson, 1998, Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children: *Clinical & Experimental Allergy*, v. 28, p. 459-467.
- Gehring, U., G. Bolte, M. Borte, W. Bischof, B. Fahlbusch, H. E. Wichmann, and J. Heinrich, 2001, Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study: *J Allergy Clin Immunol*, v. 108, p. 847-54.
- Gern, J. E., C. M. Visness, P. J. Gergen, R. A. Wood, G. R. Bloomberg, G. T. O'Connor, M. Kattan, H. A. Sampson, F. R. Witter, M. T. Sandel, W. G. Shreffler, R. J. Wright, S. J. Arbes, and W. W. Busse, 2009, The Urban Environment and Childhood Asthma (URECA) birth cohort study: design, methods, and study population: *BMC Pulm Med*, v. 9, p. 17.
- Ghannoum, M. A., R. J. Jurevic, P. K. Mukherjee, F. Cui, M. Sikaroodi, A. Naqvi, and P. M. Gillevet, 2010, Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals: *PLoS Pathog*, v. 6, p. e1000713.
- Gunnbjornsdottir, M. I., K. A. Franklin, D. Norback, E. Bjornsson, D. Gislason, E. Lindberg, C. Svanes, E. Omenaas, E. Norrman, R. Jogi, E. J. Jensen, A. Dahlman-Hoglund, and C. Janson, 2006,

RÉFÉRENCES

- Prevalence and incidence of respiratory symptoms in relation to indoor dampness: the RHINE study: *Thorax*, v. 61, p. 221-5.
- Hamilos, D. L., 2010, Allergic fungal rhinitis and rhinosinusitis: *Proc Am Thorac Soc*, v. 7, p. 245-52.
- Hamprecht, A., D. Buchheidt, J. J. Vehreschild, O. A. Cornely, B. Spiess, G. Plum, T. V. Halbsguth, N. Kutsch, D. Stippel, P. Kahl, T. Persigehl, A. Steinbach, B. Bos, M. Hallek, and M. J. Vehreschild, 2012, Azole-resistant invasive aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia in Germany: *Euro Surveill*, v. 17, p. 20262.
- Handal, G., M. A. Leiner, M. Cabrera, and D. C. Straus, 2004, Children symptoms before and after knowing about an indoor fungal contamination: *Indoor Air*, v. 14, p. 87-91.
- Hankwitz, P. E., J. S. Cervia, C. F. Thomas, J. N. Fink, T. Marras, and R. Tomic, 2011, Nontuberculous mycobacterial hypersensitivity pneumonitis related to a home shower: treatment and secondary prevention: *BMJ Case Rep*, v. 2011.
- Hansen, S., M. Strom, E. Maslova, E. L. Mortensen, C. Granstrom, and S. F. Olsen, 2012, A comparison of three methods to measure asthma in epidemiologic studies: results from the Danish National Birth Cohort: *PLoS One*, v. 7, p. e36328.
- Haugland, R. A., M. Varma, L. J. Wymer, and S. J. Vesper, 2004, Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species: *Systematic and applied microbiology*, v. 27, p. 198-210.
- Hawksworth, D. L., 2001, The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited: *Mycological Research*, v. 105, p. 1422-1432.
- Heederik, D., and E. von Mutius, 2012, Does diversity of environmental microbial exposure matter for the occurrence of allergy and asthma?: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 130, p. 44-50.
- Host, S., D. Grange, C. Sommen, E. Chatignoux, M. Dusseaux, F. R. A. Observatoire Régional de la Santé d'Ile de France. . Paris, F. R. A. Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris. Paris, and F. R. A. Centre Scientifique et Technique du Bâtiment. Paris, 2010, Effets sanitaires des moisissures dans l'habitat. L'enquête Esmha, pilote d'une étude épidémiologique en Ile-de-France, Paris, ORSIF, p. 126p.
- Howard, S. J., D. Cerar, M. J. Anderson, A. Albarrag, M. C. Fisher, A. C. Pasqualotto, M. Laverdiere, M. C. Arendrup, D. S. Perlin, and D. W. Denning, 2009, Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure: *Emerg Infect Dis*, v. 15, p. 1068-76.
- Hulin, M., S. Moularat, S. Kirchner, E. Robine, C. Mandin, and I. Annesi-Maesano, 2013, Positive associations between respiratory outcomes and fungal index in rural inhabitants of a representative sample of French dwellings: *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 216, p. 155-162.
- Husman, T., 1996, Health effects of indoor-air microorganisms: *Scand J Work Environ Health*, v. 22, p. 5-13.
- Huttunen, K., J. Pelkonen, K. F. Nielsen, U. Nuutinen, J. Jussila, and M. R. Hirvonen, 2004, Synergistic interaction in simultaneous exposure to *Streptomyces californicus* and *Stachybotrys chartarum*: *Environ Health Perspect*, v. 112, p. 659-65.
- Hyvärinen, A., T. Meklin, A. Vepsäläinen, and A. Nevalainen, 2002, Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials — concentrations and diversity: *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 49, p. 27-37.
- Inamdar, A. A., and J. W. Bennett, 2013, Volatile organic compounds from fungi isolated after hurricane katrina induce developmental defects and apoptosis in a *Drosophila melanogaster* model: *Environ Toxicol*.
- INSEE, 2011, Le taux de chômage augmente au troisième trimestre 2011, <http://www.insee.fr/fr/themes/info-rapide.asp?id=14&date=20111201>.
- INSEE, 2013, Tableaux de l'économie française, Niveaux de formation, http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?ref_id=T13F104.

RÉFÉRENCES

- Jaakkola, J. J. K., B.-F. Hwang, and M. S. Jaakkola, 2010, Home Dampness and Molds as Determinants of Allergic Rhinitis in Childhood: A 6-Year, Population-based Cohort Study: *American Journal of Epidemiology*, v. 172, p. 451-459.
- Jacob, B., B. Ritz, U. Gehring, A. Koch, W. Bischof, H. E. Wichmann, and J. Heinrich, 2002, Indoor exposure to molds and allergic sensitization: *Environ Health Perspect*, v. 110, p. 647-53.
- Jedrychowski, W., U. Maugeri, F. Perera, L. Stigter, J. Jankowski, M. Butscher, E. Mroz, E. Flak, A. Skarupa, and A. Sowa, 2011, Cognitive function of 6-year old children exposed to mold-contaminated homes in early postnatal period. Prospective birth cohort study in Poland: *Physiol Behav*, v. 104, p. 989-95.
- Karvonen, A. M., A. Hyvarinen, H. Rintala, M. Korppi, M. Taubel, G. Doekes, U. Gehring, H. Renz, P. I. Pfefferle, J. Genuneit, L. Keski-Nisula, S. Remes, J. Lampi, E. von Mutius, and J. Pekkanen, 2014, Quantity and diversity of environmental microbial exposure and development of asthma: a birth cohort study: *Allergy*.
- Karvonen, A. M., A. Hyvarinen, M. Roponen, M. Hoffmann, M. Korppi, S. Remes, E. von Mutius, A. Nevalainen, and J. Pekkanen, 2009, Confirmed moisture damage at home, respiratory symptoms and atopy in early life: a birth-cohort study: *Pediatrics*, v. 124, p. e329-38.
- Kasznia-Kocot, J., M. Kowalska, R. L. Gorny, A. Niesler, and A. Wypych-Slusarska, 2010, Environmental risk factors for respiratory symptoms and childhood asthma: *Ann Agric Environ Med*, v. 17, p. 221-9.
- Keil, T., M. Kulig, A. Simpson, A. Custovic, M. Wickman, I. Kull, K. C. Lodrup Carlsen, K. H. Carlsen, H. A. Smit, A. H. Wijga, S. Schmid, A. Von Berg, C. Bollrath, E. Eller, C. Bindslev-Jensen, S. Halken, A. Host, J. Heinrich, M. P. Fantini, B. Brunekreef, U. Kramer, S. N. Willich, U. Wahn, and S. Lau, 2006, European birth cohort studies on asthma and atopic diseases: II. Comparison of outcomes and exposures--a GA2LEN initiative: *Allergy*, v. 61, p. 1104-11.
- Keswani, J., M. L. Kashon, and B. T. Chen, 2005, Evaluation of interference to conventional and real-time PCR for detection and quantification of fungi in dust: *Journal of Environmental Monitoring*, v. 7, p. 311-318.
- Kettleson, E., S. Kumar, T. Reponen, S. Vesper, D. Méheust, S. A. Grinshpun, and A. Adhikari, 2013, *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*, and *Streptomyces* in home dust and air: associations with moldiness and other home/family characteristics: *Indoor Air*, v. 23, p. 387-396.
- Kinney, P. L., 2008, Climate Change, Air Quality, and Human Health: *American Journal of Preventive Medicine*, v. 35, p. 459-467.
- Kontoyiannis, D. P., 2013, Preventing fungal disease in chronically immunosuppressed outpatients: time for action?: *Ann Intern Med*, v. 158, p. 555-6.
- Kontoyiannis, D. P., and G. P. Bodey, 2002, Invasive aspergillosis in 2002: an update.: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 21, p. 161-72.
- Kousha, M., R. Tadi, and A. O. Soubani, 2011, Pulmonary aspergillosis: a clinical review: *Eur Respir Rev*, v. 20, p. 156-74.
- Kuhn, D. M., and M. A. Ghannoum, 2003, Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective.: *Clin Microbiol Rev*, v. 16, p. 144-72.
- Lalande, E., 2010, L'humidité dans les logements touchait un ménage sur cinq en 2006, commissariat général au développement durable. Disponible à : <http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/LPS61.pdf>.
- Latge, J. P., 2010, Tasting the fungal cell wall: *Cell Microbiol*, v. 12, p. 863-72.
- Latgé, J. P., 1999, *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: *Clin Microbiol Rev*, v. 12, p. 310-50.
- Latgé, J. P., 2001, The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*: *Trends Microbiol*, v. 9, p. 382-9.
- Legendre, P., and L. Legendre, 2012, Numerical ecology, Elsevier.
- Lockhart, S. R., J. P. Frade, K. A. Etienne, M. A. Pfaller, D. J. Diekema, and S. A. Balajee, 2011, Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Isolates from the ARTEMIS Global Surveillance Study Is Primarily Due to the TR/L98H Mutation in the cyp51A Gene: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 4465-4468.

RÉFÉRENCES

- Lynch, S. V., R. A. Wood, H. Boushey, L. B. Bacharier, G. R. Bloomberg, M. Kattan, G. T. O'Connor, M. T. Sandel, A. Calatroni, E. Matsui, C. C. Johnson, H. Lynn, C. M. Visness, K. F. Jaffee, P. J. Gergen, D. R. Gold, R. J. Wright, K. Fujimura, M. Rauch, W. W. Busse, and J. E. Gern, 2014, Effects of early-life exposure to allergens and bacteria on recurrent wheeze and atopy in urban children: *J Allergy Clin Immunol*.
- Madsen, A. M., C. B. Matthiesen, M. W. Frederiksen, M. Frederiksen, M. Frankel, M. Spilak, L. Gunnarsen, and M. Timm, 2012, Sampling, extraction and measurement of bacteria, endotoxin, fungi and inflammatory potential of settling indoor dust: *Journal of Environmental Monitoring*, v. 14, p. 3230-3239.
- Marchand, D., K. Weiss, and J.-D. Laffitte, 2010, Syndrome des bâtiments malsains ou syndrome psychogène collectif?: *Environnement, Risques & Santé*, v. 9, p. 401-407.
- Matsui, E. C., N. N. Hansel, C. Aloe, A. M. Schiltz, R. D. Peng, N. Rabinovitch, M. J. Ong, D. L. Williams, P. N. Breyse, G. B. Diette, and A. H. Liu, 2013, Indoor pollutant exposures modify the effect of airborne endotoxin on asthma in urban children: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 188, p. 1210-5.
- Meklin, T., R. A. Haugland, T. Reponen, M. Varma, Z. Lummus, D. Bernstein, L. J. Wymer, and S. J. Vesper, 2004, Quantitative PCR analysis of house dust can reveal abnormal mold conditions: *J Environ Monit*, v. 6, p. 615-20.
- Mellado, E., R. De La Camara, B. Buendia, J. L. Rodriguez-Tudela, and M. Cuenca-Estrella, 2013, Breakthrough pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection with multiple triazole resistance in a Spanish patient with chronic myeloid leukemia: *Rev Iberoam Micol*, v. 30, p. 64-8.
- Millon, L., G. Reboux, P. Bellanger, S. Roussel, S. Sornin, C. Martin, E. Deconinck, J. C. Dalphin, and R. Piarroux, 2006, Quantification de *Stachybotrys chartarum* par PCR en temps réel dans l'environnement domestique, hospitalier, et agricole: *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, v. 16, p. 183-188.
- Morio, F., G. G. Aubin, I. Danner-Boucher, A. Haloun, E. Sacchetto, D. Garcia-Hermoso, S. Bretagne, M. Miegerville, and P. Le Pape, 2012, High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis: *J Antimicrob Chemother*, v. 67, p. 1870-3.
- Morrison, J., C. Yang, K. T. Lin, R. A. Haugland, A. N. Neely, and S. J. Vesper, 2004, Monitoring *Aspergillus* species by quantitative PCR during construction of a multi-storey hospital building.: *J Hosp Infect*, v. 57, p. 85-7.
- Mortensen, K. L., R. H. Jensen, H. K. Johansen, M. Skov, T. Pressler, S. J. Howard, H. Leatherbarrow, E. Mellado, and M. C. Arendrup, 2011, *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance: *J Clin Microbiol*, v. 49, p. 2243-51.
- Mortensen, K. L., E. Mellado, C. Lass-Flörl, J. L. Rodriguez-Tudela, H. K. Johansen, and M. C. Arendrup, 2010, Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain: *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54, p. 4545-4549.
- Mudarri, D., and W. J. Fisk, 2007, Public health and economic impact of dampness and mold.: *Indoor Air*, v. 17, p. 226-35.
- Naegele, A., G. Reboux, E. Scherer, S. Roussel, and L. Millon, 2012, Fungal food choices of *Dermatophagoides farinae* affect indoor fungi selection and dispersal: *International Journal of Environmental Health Research*, v. 23, p. 91-95.
- Nagano, Y., J. S. Elborn, B. C. Millar, J. M. Walker, C. E. Goldsmith, J. Rendall, and J. E. Moore, 2010, Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis: *Med Mycol*, v. 48, p. 166-76.e1.
- Nocker, A., and A. K. Camper, 2009, Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques: *FEMS Microbiol Lett*, v. 291, p. 137-42.
- Nonnenmann, M. W., G. Coronado, B. Thompson, W. C. Griffith, J. D. Hanson, S. Vesper, and E. M. Faustman, 2012, Utilizing pyrosequencing and quantitative PCR to characterize fungal populations among house dust samples: *J Environ Monit*, v. 14, p. 2038-43.

RÉFÉRENCES

- Noss, I., I. M. Wouters, M. Visser, D. J. Heederik, P. S. Thorne, B. Brunekreef, and G. Doekes, 2008, Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air: *Appl Environ Microbiol*, v. 74, p. 5621-7.
- Oksanen, J., F. G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, G. L. Simpson, Peter Solymos, M. H. H. Stevens, and H. Wagner, 2012, *vegan: Community Ecology Package: R package version 2.0-5*.
- OMS, 2009, Guidelines for indoor air quality, dampness and mould publications, WHO Regional Office for Europe.
- Pagano, L., M. Akova, G. Dimopoulos, R. Herbrecht, L. Drgona, and N. Blijlevens, 2011, Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients: *J Antimicrob Chemother*, v. 66 Suppl 1, p. i5-14.
- Panackal, A. A., H. Li, D. P. Kontoyiannis, M. Mori, C. A. Perego, M. Boeckh, and K. A. Marr, 2010, Geoclimatic influences on invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation.: *Clin Infect Dis*, v. 50, p. 1588-97.
- Park, J. H., D. R. Gold, D. L. Spiegelman, H. A. Burge, and D. K. Milton, 2001, House dust endotoxin and wheeze in the first year of life: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 163, p. 322-8.
- Partridge-Hinckley, K., G. M. Liddell, N. G. Almyroudis, and B. H. Segal, 2009, Infection control measures to prevent invasive mould diseases in hematopoietic stem cell transplant recipients: *Mycopathologia*, v. 168, p. 329-37.
- Peláez, T., P. Muñoz, J. Guinea, M. Valerio, M. Giannella, C. H. W. Klaassen, and E. Bouza, 2012, Outbreak of invasive aspergillosis after major heart surgery caused by spores in the air of the intensive care unit: *Clinical Infectious Diseases*, v. 54, p. e24-e31.
- Perzanowski, M. S., R. L. Miller, P. S. Thorne, R. G. Barr, A. Divjan, B. J. Sheares, R. S. Garfinkel, F. P. Perera, I. F. Goldstein, and G. L. Chew, 2006, Endotoxin in inner-city homes: associations with wheeze and eczema in early childhood: *J Allergy Clin Immunol*, v. 117, p. 1082-9.
- Pihet, M., J. Carrere, B. Cimon, D. Chabasse, L. Delhaes, F. Symoens, and J.-P. Bouchara, 2009, Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis — a review: *Medical Mycology*, v. 47, p. 387-397.
- Pirofski, L. A., and A. Casadevall, 2008, The damage-response framework of microbial pathogenesis and infectious diseases: *Adv Exp Med Biol*, v. 635, p. 135-46.
- Pitkäranta, M., T. Meklin, A. Hyvärinen, A. Nevalainen, L. Paulin, P. Auvinen, U. Lignell, and H. Rintala, 2011, Molecular profiling of fungal communities in moisture damaged buildings before and after remediation--a comparison of culture-dependent and culture-independent methods: *BMC Microbiol*, v. 11, p. 235.
- Pitkäranta, M., T. Meklin, A. Hyvärinen, L. Paulin, P. Auvinen, A. Nevalainen, and H. Rintala, 2008, Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture.: *Appl Environ Microbiol*, v. 74, p. 233-44.
- Platts-Mills, T. A., D. Vervloet, W. R. Thomas, R. C. Aalberse, and M. D. Chapman, 1997, Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop, *J Allergy Clin Immunol*, v. 100: United states, p. S2-24.
- Prigitano, A., V. Venier, M. Cogliati, G. De Lorenzis, M. C. Esposto, and A. M. Tortorano, 2014, Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of northern Italy, May 2011 to June 2012: *Euro Surveill*, v. 19, p. 20747.
- R Development Core Team, 2013, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*: Vienna, Austria.
- Reboux, G., A. P. Bellanger, S. Roussel, F. Grenouillet, and L. Millon, 2010, Moulds in dwellings: health risks and involved species: *Rev Mal Respir*, v. 27, p. 169-79.
- Reboux, G., A. P. Bellanger, S. Roussel, F. Grenouillet, S. Sornin, R. Piarroux, J. C. Dalphin, and L. Millon, 2009, Indoor mold concentration in Eastern France: *Indoor Air*, v. 19, p. 446-53.
- Reboux, G., H. Gbaguidi-Haore, A. P. Bellanger, F. Demonmerot, K. Houdrouge, E. Deconinck, X. Bertrand, and L. Millon, 2014, A 10-year survey of fungal aerocontamination in hospital corridors: a reliable sentinel to predict fungal exposure risk?: *J Hosp Infect*, v. 87, p. 34-40.

RÉFÉRENCES

- Reboux, G., R. Piarroux, F. Mauny, A. Madroszyk, L. Millon, K. Bardonnnet, and J. C. Dalphin, 2001, Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 163, p. 1534-9.
- Reponen, T., L. Levin, S. Zheng, S. Vesper, P. Ryan, S. A. Grinshpun, and G. Lemasters, 2013, Family and home characteristics correlate with mold in homes: *Environ Res*, v. 124, p. 67-70.
- Reponen, T., J. Lockey, D. I. Bernstein, S. J. Vesper, L. Levin, G. K. Khurana Hershey, S. Zheng, P. Ryan, S. A. Grinshpun, M. Villareal, and G. Lemasters, 2012, Infant origins of childhood asthma associated with specific molds: *J Allergy Clin Immunol*, v. 130, p. 639-644.e5.
- Reponen, T., S. Vesper, L. Levin, E. Johansson, P. Ryan, J. Burkle, S. A. Grinshpun, S. Zheng, D. I. Bernstein, J. Lockey, M. Villareal, G. K. Khurana Hershey, and G. LeMasters, 2011, High environmental relative moldiness index during infancy as a predictor of asthma at 7 years of age: *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, v. 107, p. 120-126.
- Rhame, F. S., 1991, Prevention of nosocomial aspergillosis: *Journal of Hospital Infection*, v. 18, Supplement A, p. 466-472.
- Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch, D. Carr, R. Schierl, D. Nowak, and E. von Mutius, 2001, Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey: *Lancet*, v. 358, p. 1129-33.
- Rintala, H., A. Hyvärinen, L. Paulin, and A. Nevalainen, 2004, Detection of streptomyces in house dust--comparison of culture and PCR methods: *Indoor Air*, v. 14, p. 112-9.
- Rintala, H., and A. Nevalainen, 2006, Quantitative measurement of streptomyces using real-time PCR: *Journal of Environmental Monitoring*, v. 8, p. 745-749.
- Roussel, S., G. Reboux, A. P. Bellanger, S. Sornin, F. Grenouillet, J. C. Dalphin, R. Piarroux, and L. Millon, 2008, Characteristics of dwellings contaminated by moulds: *J Environ Monit*, v. 10, p. 724-9.
- Roussel, S., G. Reboux, A. Naegele, J. Martinez, M. Vacheyrou, E. Scherer, and L. Millon, 2013, Detecting and quantifying mites in domestic dust: A novel application for real-time PCR: *Environment International*, v. 55, p. 20-24.
- Roussel, S., B. Sudre, G. Reboux, M. Waser, G. Buchele, M. Vacheyrou, J. C. Dalphin, L. Millon, C. Braun-Fahrlander, E. von Mutius, and R. Piarroux, 2011, Exposure to moulds and actinomycetes in Alpine farms: a nested environmental study of the PASTURE cohort: *Environ Res*, v. 111, p. 744-50.
- Ruiz-Camps, I., J. M. Aguado, B. Almirante, E. Bouza, C. F. Ferrer-Barbera, O. Len, L. Lopez-Cerero, J. L. Rodriguez-Tudela, M. Ruiz, A. Sole, C. Vallejo, L. Vazquez, R. Zaragoza, and M. Cuenca-Estrella, 2011, Guidelines for the prevention of invasive mould diseases caused by filamentous fungi by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC): *Clin Microbiol Infect*, v. 17 Suppl 2, p. 1-24.
- Salo, P. M., S. J. Arbes Jr, M. Sever, R. Jaramillo, R. D. Cohn, S. J. London, and D. C. Zeldin, 2006, Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 118, p. 892-898.
- Scherer, E., S. Rocchi, G. Reboux, S. Vandentorren, S. Roussel, M. Vacheyrou, C. Raherison, and L. Millon, 2014, qPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dust from dwellings in large cohort studies: *Science of The Total Environment*, v. 466-467, p. 716-724.
- Schram-Bijkerk, D., G. Doekes, J. Douwes, M. Boeve, J. Riedler, E. Ublagger, E. von Mutius, M. R. Benz, G. Pershagen, M. van Hage, A. Scheynius, C. Braun-Fahrlander, M. Waser, and B. Brunekreef, 2005, Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study: *Clin Exp Allergy*, v. 35, p. 1272-8.
- Seltzer, J. M., and M. J. Fedoruk, 2007, Health Effects of Mold in Children: *Pediatric Clinics of North America*, v. 54, p. 309-333.
- Sen, K., and D. M. Asher, 2001, Multiplex PCR for detection of Enterobacteriaceae in blood: *Transfusion*, v. 41, p. 1356-1364.

RÉFÉRENCES

- Sherertz, R. J., A. Belani, B. S. Kramer, G. J. Elfenbein, R. S. Weiner, M. L. Sullivan, R. G. Thomas, and G. P. Samsa, 1987, Impact of air filtration on nosocomial *Aspergillus* infections. Unique risk of bone marrow transplant recipients: *Am J Med*, v. 83, p. 709-18.
- Sidot, C., P. Simon, J. P. Bouchara, D. Chabasse, T. Urban, and J. L. Giniès, 2007, 116 *Scedosporium apiospermum*. Environmental study in the homes of patients with cystic fibrosis: *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, v. 6, p. S29.
- Simoni, M., E. Lombardi, G. Berti, F. Rusconi, S. La Grutta, S. Piffer, M. G. Petronio, C. Galassi, F. Forastiere, and G. Viegi, 2005, Effects of indoor exposures on respiratory and allergic disorders: *Epidemiol Prev*, v. 29, p. 57-61.
- Sivasubramani, S. K., R. T. Niemeier, T. Reponen, and S. A. Grinshpun, 2004, Assessment of the aerosolization potential for fungal spores in moldy homes: *Indoor Air*, v. 14, p. 405-412.
- Snelders, E., S. M. T. Camps, A. Karawajczyk, G. Schaftenaar, G. H. J. Kema, H. A. van der Lee, C. H. Klaassen, W. J. G. Melchers, and P. E. Verweij, 2012, Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*: *PLoS ONE*, v. 7, p. e31801.
- Snelders, E., R. A. G. Huis in 't Veld, A. J. M. M. Rijs, G. H. J. Kema, W. J. G. Melchers, and P. E. Verweij, 2009, Possible Environmental Origin of Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Medical Triazoles: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 4053-4057.
- Snelders, E., H. A. L. van der Lee, J. Kuijpers, A. J. M. M. Rijs, J. Varga, R. A. Samson, E. Mellado, A. R. T. Donders, W. J. G. Melchers, and P. E. Verweij, 2008, Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Spread of a Single Resistance Mechanism: *PLoS Med*, v. 5, p. e219.
- Solomon, G. M., M. Hjelmroos-Koski, M. Rotkin-Ellman, and S. K. Hammond, 2006, Airborne mold and endotoxin concentrations in New Orleans, Louisiana, after flooding, October through November 2005: *Environ Health Perspect*, v. 114, p. 1381-6.
- Sordillo, J. E., U. K. Alwis, E. Hoffman, D. R. Gold, and D. K. Milton, 2011, Home characteristics as predictors of bacterial and fungal microbial biomarkers in house dust: *Environ Health Perspect*, v. 119, p. 189-95.
- Soto-Ramirez, N., A. H. Ziyab, W. Karmaus, H. Zhang, R. J. Kurukulaaratchy, S. Ewart, and S. H. Arshad, 2013, Epidemiologic methods of assessing asthma and wheezing episodes in longitudinal studies: measures of change and stability: *J Epidemiol*, v. 23, p. 399-410.
- Spengler, J. D., J. J. Jaakkola, H. Parise, B. A. Katsnelson, L. I. Privalova, and A. A. Kosheleva, 2004, Housing characteristics and children's respiratory health in the Russian Federation: *Am J Public Health*, v. 94, p. 657-62.
- Stark, P. C., J. C. Celedon, G. L. Chew, L. M. Ryan, H. A. Burge, M. L. Mulienberg, and D. R. Gold, 2005, Fungal levels in the home and allergic rhinitis by 5 years of age: *Environ Health Perspect*, v. 113, p. 1405-9.
- Stensvold, C. R., L. N. Jørgensen, and M. C. Arendrup, 2012, Azole-Resistant Invasive Aspergillosis: Relationship to Agriculture: *Current Fungal Infection Reports*, p. 1-14.
- Stevens, D. A., R. B. Moss, V. P. Kurup, A. P. Knutsen, P. Greenberger, M. A. Judson, D. W. Denning, R. Cramer, A. S. Brody, M. Light, M. Skov, W. Maish, G. Mastella, and P. i. t. C. F. F. C. Conference, 2003, Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference: *Clin Infect Dis*, v. 37 Suppl 3, p. S225-64.
- Sudre, B., M. Vacheyrou, C. Braun-Fahrlander, A. C. Normand, M. Waser, G. Reboux, P. Ruffaldi, E. von Mutius, and R. Piarroux, 2009, High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment?: *Allergy*, v. 64, p. 1068-73.
- Sullivan, S. D., and K. B. Weiss, 2001, Health economics of asthma and rhinitis. II. Assessing the value of interventions: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 107, p. 203-210.
- Tibshirani, R., G. Walther, and T. Hastie, 2001, Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic: *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, v. 63, p. 411-423.
- Tillie-Leblond, I., F. Grenouillet, G. Reboux, S. Roussel, B. Chouraki, C. Lorthois, J. C. Dalphin, B. Wallaert, and L. Millon, 2011, Hypersensitivity pneumonitis and metalworking fluids contaminated by mycobacteria: *Eur Respir J*, v. 37, p. 640-7.

RÉFÉRENCES

- Tischer, C., C. M. Chen, and J. Heinrich, 2011a, Association between domestic mould and mould components, and asthma and allergy in children: a systematic review: *European Respiratory Journal*, v. 38, p. 812-824.
- Tischer, C. G., C. Hohmann, E. Thiering, O. Herbarth, A. Muller, J. Henderson, R. Granell, M. P. Fantini, L. Luciano, A. Bergstrom, I. Kull, E. Link, A. von Berg, C. E. Kuehni, M. P. Strippoli, U. Gehring, A. Wijga, E. Eller, C. Bindselev-Jensen, T. Keil, and J. Heinrich, 2011b, Meta-analysis of mould and dampness exposure on asthma and allergy in eight: *Allergy*, v. 66, p. 1570-9.
- Tomblyn, M., T. Chiller, H. Einsele, R. Gress, K. Sepkowitz, J. Storek, J. R. Wingard, J. A. Young, and M. J. Boeckh, 2009, Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective: *Biol Blood Marrow Transplant*, v. 15, p. 1143-238.
- Torvinen, E., T. Meklin, P. Torkko, S. Suomalainen, M. Reiman, M.-L. Katila, L. Paulin, and A. Nevalainen, 2006, Mycobacteria and fungi in moisture-damaged building materials: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 6822-6824.
- Tovey, E. R., M. D. Chapman, and T. A. Platts-Mills, 1981, Mite faeces are a major source of house dust allergens: *Nature*, v. 289, p. 592-3.
- Tse, A. C., J. W. Rich-Edwards, K. Koenen, and R. J. Wright, 2012, Cumulative stress and maternal prenatal corticotropin-releasing hormone in an urban U.S. cohort: *Psychoneuroendocrinology*, v. 37, p. 970-9.
- Vacheyrou, M., A.-C. Normand, P. Guyot, C. Cassagne, R. Piarroux, and Y. Bouton, 2011, Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms: *International Journal of Food Microbiology*, v. 146, p. 253-262.
- van der Linden, J. W., S. M. Camps, G. A. Kampinga, J. P. Arends, Y. J. Debets-Ossenkopp, P. J. Haas, B. J. Rijnders, E. J. Kuijper, F. H. van Tiel, J. Varga, A. Karawajczyk, J. Zoll, W. J. Melchers, and P. E. Verweij, 2013, Aspergilliosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles: *Clin Infect Dis*, v. 57, p. 513-20.
- Vandentorren, S., C. Bois, C. Pirus, H. Sarter, G. Salines, H. Leridon, and t. E. team, 2009, Rationales, design and recruitment for the Elfe longitudinal study: *BMC Pediatrics*, v. 9, p. 58.
- Verhoeff, A. P., E. S. van Reenen-Hoekstra, R. A. Samson, B. Brunekreef, and J. H. van Wijnen, 1994, Fungal propagules in house dust. I. Comparison of analytic methods and their value as estimators of potential exposure.: *Allergy*, v. 49, p. 533-9.
- Vermeulen, E., J. Maertens, H. Schoemans, and K. Lagrou, 2012, Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, July 2012: *Euro Surveill*, v. 17.
- Verweij, P. E., S. M. Camps, G. H. Kema, and W. J. Melchers, 2011, Comment on: Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies, *J Antimicrob Chemother*, v. 66: England, p. 954-5; author reply 955.
- Verweij, P. E., S. J. Howard, W. J. Melchers, and D. W. Denning, 2009a, Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints: *Drug Resist Updat*, v. 12, p. 141-7.
- Verweij, P. E., E. Snelders, G. H. Kema, E. Mellado, and W. J. Melchers, 2009b, Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use?: *Lancet Infect Dis*, v. 9, p. 789-95.
- Vesper, S., 2011, Traditional mould analysis compared to a DNA-based method of mould analysis: *Crit Rev Microbiol*, v. 37, p. 15-24.
- Vesper, S., C. Barnes, C. E. Ciaccio, A. Johanns, K. Kennedy, J. S. Murphy, A. Nunez-Alvarez, M. T. Sandel, D. Cox, G. Dewalt, and P. J. Ashley, 2013, Higher Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values measured in homes of asthmatic children in Boston, Kansas City, and San Diego: *J Asthma*, v. 50, p. 155-61.
- Vesper, S., C. McKinstry, P. Ashley, R. Haugland, K. Yeatts, K. Bradham, and E. Svendsen, 2007a, Quantitative PCR analysis of molds in the dust from homes of asthmatic children in North Carolina.: *J Environ Monit*, v. 9, p. 826-30.

RÉFÉRENCES

- Vesper, S., C. McKinstry, C. Hartmann, M. Neace, S. Yoder, and A. Vesper, 2008a, Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *J Microbiol Methods*, v. 72, p. 180-4.
- Vesper, S., C. McKinstry, R. Haugland, L. Neas, E. Hudgens, B. Heidenfelder, and J. Gallagher, 2008b, Higher Environmental Relative Moldiness Index (ERMIsm) values measured in Detroit homes of severely asthmatic children: *Sci Total Environ*, v. 394, p. 192-6.
- Vesper, S., C. McKinstry, R. Haugland, L. Wymer, K. Bradham, P. Ashley, D. Cox, G. Dewalt, and W. Friedman, 2007b, Development of an Environmental Relative Moldiness index for US homes: *J Occup Environ Med*, v. 49, p. 829-33.
- Vesper, S. J., C. McKinstry, R. A. Haugland, Y. Iossifova, G. Lemasters, L. Levin, G. K. Khurana Hershey, M. Villareal, D. I. Bernstein, J. Lockey, and T. Reponen, 2007c, Relative moldiness index as predictor of childhood respiratory illness: *J Expo Sci Environ Epidemiol*, v. 17, p. 88-94.
- Vesper, S. J., C. McKinstry, C. Yang, R. A. Haugland, C. M. Kercsmar, I. Yike, M. D. Schluchter, H. L. Kirchner, J. Sobolewski, T. M. Allan, and D. G. Dearborn, 2006, Specific molds associated with asthma in water-damaged homes: *J Occup Environ Med*, v. 48, p. 852-8.
- Vesper, S. J., M. Varma, L. J. Wymer, D. G. Dearborn, J. Sobolewski, and R. A. Haugland, 2004, Quantitative polymerase chain reaction analysis of fungi in dust from homes of infants who developed idiopathic pulmonary hemorrhaging.: *J Occup Environ Med*, v. 46, p. 596-601.
- von Mutius, E., 2007, Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence: *Immunobiology*, v. 212, p. 433-9.
- Vrijheid, M., M. Casas, A. Bergstrom, A. Carmichael, S. Cordier, M. Eggesbo, E. Eller, M. P. Fantini, M. F. Fernandez, A. Fernandez-Somoano, U. Gehring, R. Grazuleviciene, C. Hohmann, A. M. Karvonen, T. Keil, M. Kogevinas, G. Koppen, U. Kramer, C. E. Kuehni, P. Magnus, R. Majewska, A. M. Andersen, E. Patelarou, M. S. Petersen, F. H. Pierik, K. Polanska, D. Porta, L. Richiardi, A. C. Santos, R. Slama, R. J. Sram, C. Thijs, C. Tischer, G. Toft, T. Trnovec, S. Vandentorren, T. G. Vrijkotte, M. Wilhelm, J. Wright, and M. Nieuwenhuijsen, 2012, European birth cohorts for environmental health research: *Environ Health Perspect*, v. 120, p. 29-37.
- Ward, M. D., L. B. Copeland, J. Lehmann, D. L. Doerfler, and S. J. Vesper, 2014, Assessing the allergenic potential of molds found in water-damaged homes in a mouse model: *Inhal Toxicol*, v. 26, p. 474-84.
- Warris, A., A. Onken, P. Gaustad, W. Janssen, H. van der Lee, P. E. Verweij, and T. G. Abrahamsen, 2010, Point-of-use filtration method for the prevention of fungal contamination of hospital water: *J Hosp Infect*, v. 76, p. 56-9.
- Warris, A., A. Voss, and P. E. Verweij, 2001, Hospital sources of *Aspergillus* species: New routes of transmission?: *Revista iberoamericana de micología*, v. 18, p. 156-162.
- Wood, S., 2006, Generalized additive models: an introduction with R, CRC press.
- Zureik, M., C. Neukirch, B. Leynaert, R. Liard, J. Bousquet, F. Neukirch, and E. C. R. H. Survey, 2002, Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey: *BMJ*, v. 325, p. 411-4.

RÉSUMÉ

L'objectif de la thèse était d'étudier la composition microbiologique d'environnements intérieurs afin d'évaluer les microorganismes, ou profils de microorganismes, liés aux développements de pathologies respiratoires, par catégorie de patients (immunodéprimés ou allergiques)

Pour cela, des études locales, FIQCS et TIARÉ, ont respectivement été réalisées aux domiciles de patients immunodéprimés (à risque d'infection fongique invasive) et de patients atteints de mucoviscidose (à risque d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique). D'autre part, dans le cadre de l'étude ELFE (Etude Longitudinale Française depuis l'Enfance), des prélèvements provenant de logements de 3200 enfants ont été analysés.

Dans l'étude FIQCS, les 4 patients ayant les plus hauts pourcentages d'*A. fumigatus* et *A. flavus* comparativement à la flore fongique totale de leur logement sont 4 patients qui ont développé une AI/IFI et 3 d'entre eux n'ont visiblement été exposés qu'à domicile (aucune contamination détectée à l'hôpital lors de leur séjour). Ce concept de pourcentage d'*A. fumigatus* et *A. flavus* est le seul facteur prédictif d'AI/IFI qui est ressorti de l'analyse statistique faite lors de cette étude et montre l'intérêt des mesures préventives aux domiciles des patients. Deux souches d'*A. fumigatus* résistantes portant la mutation TR34/L98H ont été retrouvées dans les expectorations d'un patient d'hématologie et une souche portant la même mutation a été identifiée dans un prélèvement de sol à côté de son domicile.

Parmi les 3200 logements ELFE analysés, six profils de logements différents, caractérisés par leur contamination en 10 microorganismes (qPCR ciblant 6 moisissures, 3 bactéries, 1 acarien) ont été définis. Ces six profils sont présents dans toutes les régions de France, mais ont une répartition différente. Les caractéristiques intrinsèques des logements ont également été étudiées.

Dans l'étude TIARE, les logements de patients qui développent une aspergillose broncho-pulmonaire allergique semblent avoir des quantités d'*A. fumigatus* détectées par qPCR supérieures.

Les travaux de ces différentes études montrent la diversité des logements quant à leur caractéristique microbiologiques (diversité des espèces et niveau des concentrations) et démontrent ainsi l'importance des mesures environnementales aux domiciles pour prévenir les risques infectieux et allergiques.

Mots-clés : environnement intérieur, composition microbiologique, risques infectieux et allergiques, culture, qPCR, marqueurs d'exposition